

PABLO PANDOLFO

**DIFERENTES RESPOSTAS REFORÇADORAS E LOCOMOTORAS  
INDUZIDAS PELA ATIVAÇÃO ENDOCANABINÓIDE EM RATOS  
ADOLESCENTES E ADULTOS DAS LINHAGENS WISTAR E SHR**

Florianópolis – SC  
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**DIFERENTES RESPOSTAS REFORÇADORAS E LOCOMOTORAS  
INDUZIDAS PELA ATIVAÇÃO ENDOCANABINÓIDE EM RATOS  
ADOLESCENTES E ADULTOS DAS LINHAGENS WISTAR E SHR**

PABLO PANDOLFO

**Florianópolis – SC  
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**DIFERENTES RESPOSTAS REFORÇADORAS E LOCOMOTORAS  
INDUZIDAS PELA ATIVAÇÃO ENDOCANABINÓIDE EM RATOS  
ADOLESCENTES E ADULTOS DAS LINHAGENS WISTAR E SHR**

PABLO PANDOLFO

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia  
do Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial à obtenção do  
título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

**Florianópolis – SC  
2007**

"Duvidar de tudo ou crer em tudo são duas soluções igualmente cômodas,  
que nos dispensam, ambas, de refletir".

(Jules-Henri Poincaré)

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
Odila e Sérgio, pelo incentivo e amor.  
Ao meu irmão, Jeferson, pela amizade.  
À minha companheira,  
Grasielle, pela convivência.**

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi, pelo incentivo e orientação durante estes anos de convívio;

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, que sempre me guiaram com entusiasmo e competência;

Aos colegas do laboratório, Luciano, Manu, Meigy, Rafael, Robson e Vanessa por tornar o cotidiano mais agradável;

Aos colaboradores e amigos Leandro, Pamplona e Rui pelas discussões que ajudaram a realizar este trabalho;

Aos demais colegas e funcionários do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, por terem de alguma forma contribuído para a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

---

---

LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT .....	XI
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A adolescência e o consumo de drogas .....	2
1.2. Sistema canabinóide.....	4
1.3. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade .....	7
1.4. Sistema de recompensa .....	9
1.5. Modelos animais de TDAH .....	10
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais .....	14
3.2. Drogas .....	15
3.3. Campo-aberto.....	16
3.4. Labirinto em cruz elevado.....	17
3.5. Preferência condicionada de lugar .....	18
3.6. Procedimentos experimentais.....	19
3.7. Análise estatística .....	20
4. RESULTADOS .....	22
5. DISCUSSÃO .....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
ANEXO.....	70

## LISTA DE FIGURAS

---

---

<b>Figura 1.</b> Fotografia do campo aberto. ....	16
<b>Figura 2.</b> Fotografia do labirinto em cruz elevado. ....	17
<b>Figura 3.</b> Fotografia da preferência condicionada de lugar. ....	19
<b>Figura 4.</b> Efeitos da ativação do sistema canabinóide nos parâmetros relacionados à ansiedade no teste do campo aberto em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR. ....	22
<b>Figura 5.</b> Influência do tratamento com AM 251 nos efeitos induzidos pelo WIN nos índices relacionados à ansiedade em ratos adolescentes SHR no teste do campo aberto ....	26
<b>Figura 6.</b> Efeitos da ativação do sistema canabinóide na atividade locomotora no teste do campo aberto em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR. ....	28
<b>Figura 7.</b> Influência da administração de AM 251 na estimulação locomotora induzida pelo WIN em ratos adolescentes SHR no teste do campo aberto ....	30
<b>Figura 8.</b> Efeitos da ativação do sistema canabinóide nos índices relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR. ....	31
<b>Figura 9.</b> Propriedades reforçadoras ou aversivas da ativação do sistema canabinóide avaliadas no teste da preferência condicionada de lugar em ratos adolescentes e adultos da linhagem Wistar. ....	34
<b>Figura 10.</b> Propriedades reforçadoras ou aversivas da ativação do sistema canabinóide avaliadas no teste da preferência condicionada de lugar em ratos adolescentes e adultos da linhagem SHR. ....	35
<b>Figura 11.</b> Influência do tratamento com AM 251 nas propriedades reforçadoras ou aversivas induzidas pelo WIN no teste da preferência condicionada de lugar. ....	38
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática dos possíveis locais de ação do sistema endocanabinóide na modulação do sistema de recompensa. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATV</b>	área tegmental ventral
<b>CA</b>	campo aberto
<b>CPFM</b>	córtex pré-frontal medial
<b>DA</b>	dopamina
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>EF</b>	número de entradas nos braços fechados do LCE
<b>FMP</b>	feixe medial prosencefálico
<b>GPV</b>	globo pálido ventral
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>LCE</b>	labirinto em cruz elevado
<b>MAO</b>	monoamino oxidase
<b>Nac</b>	núcleo <i>accumbens</i>
<b>PCL</b>	preferência condicionada de lugar
<b>PN</b>	pós-natal
<b>SHR</b>	<i>spontaneously hypertensive rats</i>
<b>SNC</b>	sistema nervoso central
<b>TDAH</b>	transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
<b>WIN</b>	WIN 55,212-2
<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol
<b>%EA</b>	porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE
<b>%TA</b>	porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE

## RESUMO

---

Várias evidências apontam para a adolescência como um período crítico para o início de uma ampla escala de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e o abuso de drogas. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são geralmente considerados um modelo genético apropriado para o estudo do TDAH, uma vez que esses animais apresentam características comportamentais do transtorno, tais como hiperatividade, impulsividade, prejuízos na atenção sustentada, déficits cognitivos e aumento da busca pela novidade. Apesar da alta prevalência do TDAH em adolescentes, os estudos que utilizam a linhagem SHR foram realizados principalmente em animais adultos. O foco do presente estudo foi investigar a participação do sistema canabinóide, através da administração aguda intraperitoneal (i.p.) do agonista dos receptores canabinóide WIN 55.212-2 (WIN: 0,125; 0,25; 1,25; ou 2,5 mg/kg), na atividade locomotora, em comportamentos relacionados à ansiedade e nas propriedades reforçadoras em ratos machos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR. Para esse propósito foi utilizado o teste do campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e da preferência condicionada de lugar (PCL). A administração de WIN nas doses de 0,25 e 1,25 mg/kg (i.p.) promoveu seletivamente estimulação locomotora em SHR adolescentes, mas não em animais adultos SHR ou em ratos Wistar (independentemente da idade). Ainda que as doses testadas de WIN não tenham causado efeitos em comportamentos relacionados à ansiedade quando avaliadas no CA (locomoção central) ou no LCE (tempo nos braços abertos), a maior dose WIN testada (2,5 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente o número de entradas nos braços fechados (um índice indicativo de redução da atividade locomotora) de ratos adolescentes das duas linhagens no LCE. Além disso, os resultados do presente estudo mostram que o tratamento com WIN induz respostas contraditórias nos efeitos reforçadores na PCL. Na linhagem Wistar, a faixa de dose entre 0,25 e 2,5 mg/kg produziu claramente aversão em ratos adultos, enquanto que em ratos adolescentes não produziu quaisquer efeitos. Na linhagem SHR, a administração de WIN induziu efeitos reforçadores em ambas as idades, em baixa dose (0,25 mg/kg, i.p.) para ratos adultos e em alta dose (2,5 mg/kg, i.p.) para ratos adolescentes. Os efeitos do WIN na locomoção e nas propriedades reforçadoras foram bloqueados pelo pré-tratamento com o AM 251, um antagonista seletivo dos receptores canabinóides do subtipo CB1. Os resultados do presente estudo indicam efeitos de um agonista canabinóide dependentes da linhagem e da idade, na atividade locomotora e nas propriedades reforçadoras, estendendo a noção de que a adolescência e os comportamentos observados em ratos SHR representam fatores de risco para a sensibilidade aumentada aos efeitos de drogas.

## ABSTRACT

---

Converging evidence points to adolescence as a critical period for the onset of a wide range of neuropsychiatric disorders, including attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and drug abuse. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are generally considered to be a suitable genetic model for the study of ADHD, since they display several behavioral characteristics of this disorder such as hyperactivity, impulsivity, poorly sustained attention, cognitive deficits and increased novelty seeking. Despite the high prevalence of ADHD among adolescents, studies using the SHR strain have mainly been performed on adult animals. The aim of the present study was to evaluate the effect of acute intraperitoneal (i.p.) administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 (WIN: 0.125, 0.25, 1.25 or 2.5 mg/kg) on locomotor activity, anxiety-like behavior and reinforcing properties in male adolescent and adult SHR animals and Wistar rats using the open field (OF), elevated plus-maze (EPM) and conditioned place preference (CCP) tests. WIN at doses of 0.25 and 1.25 mg/kg (i.p.) selectively promoted locomotor stimulation in adolescent SHR animals in the OF, but not in adult animals of this strain or Wistar rats (regardless of age). Although the present doses of WIN had no effect on anxiety-related behaviors in any of the groups evaluated in the OF (central locomotion) or EPM (time in open arms), the highest dose of WIN tested (2.5 mg/kg, i.p.) significantly decreased the number of closed-arm entries (an index of locomotor activity) of adolescent rats from both Wistar and SHR strains in the EPM. Moreover, the present results showed that WIN induced contradictory responses on the rewarding effects in the CCP. In Wistar strain, doses ranged between 0.25 and 2.5 mg/kg clearly produced aversion in adult rats, while in adolescent rats it produced no effects. In the SHR strain, administration of WIN induced reward in both ages, at the lowest dose (0.25 mg/kg, i.p.) for adult rats and at the highest dose (2.5 mg/kg, i.p.) for adolescent rats. The effect of WIN on locomotion and reinforcement properties was reversed by pretreatment with the selective cannabinoid CB1 receptor antagonist AM 251. The present results indicate strain- and age-dependent effects of cannabinoids on the locomotor activity and rewarding effects in rats, extending the notion that adolescence and ADHD represent risk factors for an increased sensitivity to the effects of drugs.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes, afetando cerca de 2 a 12% das crianças em idade escolar (Swanson *et al.*, 1998). Este transtorno costuma se manifestar em idade inferior a sete anos, e cerca de 30% dos indivíduos que apresentaram TDAH na infância ou adolescência continuarão com a patologia na idade adulta (Muglia *et al.*, 2000). Apesar do diagnóstico ainda não estar completamente definido, pode-se considerar que a sintomatologia primária do TDAH se caracteriza por hiperatividade, impulsividade e déficit de atenção (Himmelstein *et al.*, 2000; Taylor, 1998). Além disso, há um interesse substancial numa possível conexão entre o TDAH e o uso e abuso de drogas, particularmente durante a adolescência. Para essa relação existe uma considerável literatura disponível, pois, recentemente, houve um aumento no reconhecimento da comorbidade do TDAH e o abuso de substâncias entre adolescentes e adultos (Gerra *et al.*, 1994; Schubiner *et al.*, 2000; Robbins 2002; Vaiva *et al.*, 2002; Wilens 2004; Cardinal *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2004; Carpentier *et al.*, 2005; Guerriero *et al.*, 2006).

O TDAH pode ser um importante fator na patogênese e manutenção da dependência de drogas, uma vez que estudos sugerem que o tratamento de portadores do TDAH durante a infância pode impedir o desenvolvimento do consumo abusivo de substâncias (Andersen *et al.*, 2002); bem como o tratamento em adultos, e possivelmente, em adolescentes dependentes, pode reduzir o risco de recaídas (Wilson e Levin, 2005). Assim, tanto a

adolescência como o TDAH criam condições particularmente sensíveis aos efeitos reforçadores de drogas de abuso.

### **1.1. A adolescência e o consumo de drogas**

A adolescência é um período da vida caracterizado por um processo complexo de desenvolvimento biológico, psicológico e social. Esta fase está freqüentemente associada com níveis elevados de busca ao prazer, agitação e comportamentos de risco (Arnett, 1992; Wills *et al.*, 1999). O conhecimento sobre a adolescência está mudando, pois atualmente tem-se demonstrado que o cérebro humano continua a se desenvolver durante a adolescência (Paus *et al.*, 1999; Sowell *et al.*, 2003). Estudos clínicos utilizando imagens de ressonância magnética mostram uma acentuada diminuição na densidade da massa cinzenta em diversas áreas do cérebro durante períodos de transição entre a infância, adolescência e idade adulta (De Bellis *et al.*, 2001; Sowell *et al.*, 2001). Recentemente, foi sugerido que a perda gradual de sinapses, aliada ao fortalecimento das conexões sinápticas remanescentes, coincide com a maturação das habilidades cognitivas durante a infância e a adolescência (Casey *et al.*, 2000). Segundo Chambers *et al.* (2003), o desenvolvimento dos circuitos encefálicos relacionados à motivação e à tomada de decisões torna a adolescência um período crítico de vulnerabilidade para a falta do controle impulsivo e aumento do comportamento de busca às drogas.

Adolescentes consomem drogas por diversos fatores que atuam de várias maneiras sobre diferentes indivíduos e não existem razões simples pelas quais muitos consomem drogas, logo, não existem soluções fáceis para resolver esse fenômeno. Esses fatores incluem o rito de passagem da puberdade, o próprio desenvolvimento da adolescência (biológico e psicológico), transtornos mentais como o TDAH, caos ambiental e ampla disponibilidade de drogas (ver Greydanus e Patel, 2005). Várias teorias foram propostas para a etiologia do abuso de drogas, incluindo o modelo da escalada ou da porta de entrada (do inglês, *Gateway Model*) e o modelo do comportamento de risco proposto por Jessor (do inglês, *Risk Behavior Model of Jessor*). No modelo da escalada ou da porta de entrada, o uso de uma determinada droga aumenta a probabilidade da progressão a outras drogas. Por exemplo, o indivíduo progride do consumo de cerveja e cigarro para a maconha e, eventualmente, para a cocaína e outras drogas ilícitas (Kandel e Logan, 1984). Já no modelo do comportamento de risco, uma condição psicossocial subjacente pode explicar o comportamento de risco. Por exemplo, o uso de uma substância é funcional para conseguir objetivos pessoais ou lidar com uma falha, aborrecimento e/ou baixa estima (Jessor, 1991). Outras teorias focam na interação complexa de fatores pessoais (cognição, atitudes, opiniões), fatores genético-fisiológicos e fatores ambientais.

É bastante comum que o uso de agentes psicoativos passíveis de abuso comece a acontecer por volta do início da puberdade e adolescência. Estudos demonstram que grande parte dos usuários de drogas, como psicoestimulantes e heroína, iniciaram consumindo tabaco e/ou etanol durante

a adolescência (Yamaguchi e Kandel, 1984). Por outro lado, indivíduos que começam a consumir etanol na idade adulta apresentam menor probabilidade de passarem a fazer uso de outras drogas (Clark *et al.*, 1998). Estas evidências sugerem que pode haver uma maior vulnerabilidade dos adolescentes aos efeitos das drogas de abuso, podendo favorecer o aparecimento de comportamentos relacionados à dependência durante a idade adulta. Das substâncias comumente abusadas por humanos, os derivados da *Cannabis sativa* parecem ser os mais extensamente consumidos em todo o mundo, especialmente por adolescentes. Porém, em animais de laboratório não há consenso a respeito dos efeitos reforçadores dos canabinóides. Enquanto alguns estudos mostram que agonistas canabinóides possuem propriedades reforçadoras em roedores, outros relatam efeitos aversivos ou não conclusivos (Takahashi e Singer, 1979; McGregor *et al.*, 1996; Chaperon *et al.*, 1998; Valjent e Maldonado, 2000). Uma variedade de ensaios comportamentais em roedores tem sido utilizada para investigar as propriedades reforçadoras de drogas comumente abusadas por humanos (ver Gardner, 2002). Esses ensaios incluem o modelo da preferência condicionada de lugar, a auto-administração de drogas e procedimentos de re-estabelecimento.

## **1.2. Sistema canabinóide**

A *Cannabis sativa* é provavelmente uma das primeiras plantas não-alimentícias cultivadas pelo homem, cuja produção foi originalmente

introduzida pelos povos orientais. As primeiras evidências arqueológicas da utilização dos derivados da *Cannabis* por populações humanas datam de cerca de 10.000 anos atrás, quando fibras do cânhamo eram utilizadas para a fabricação de cordas e vestuário (Childers e Breivogel, 1998). Em 1964, o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) foi isolado e identificado a partir do haxixe e é reconhecido como o constituinte principal da *Cannabis* (Gaoni e Mechoulam, 1964; Karniol e Carlini, 1973); pois apesar de cerca de outros 60 canabinóides naturalmente obtidos da *Cannabis*, como o canabigerol, canabidiol, canabinol, canabicromeno e o canabicitolol já terem sido descritos (Makriyannis *et al.*, 2005), o  $\Delta^9$ -THC é considerado o principal responsável pelos efeitos psicoativos desta planta.

Os efeitos agudos dos canabinóides originalmente descritos em usuários de maconha incluem problemas cognitivos gerais, sensação de dilatação do tempo, leves alterações visuais e auditivas, falta de coordenação motora, sonolência, boca seca, fome exagerada, vermelhidão nos olhos, alterações de humor (euforia ou disforia), taquicardia, hipotensão e diminuição do tônus muscular (“relaxamento”) (Hollister, 1986). Apesar de diversos estudos clínicos terem sido realizados, há poucos relatos dos efeitos crônicos em usuários de maconha, incluindo ganho de peso corporal, bradicardia, diminuição geral de motivação, diminuição dos níveis séricos de testosterona e uma diminuição da resposta imune inata (Hollister, 1986; Carlini, 2004). Além disso, há que se salientar que altas doses de maconha, mesmo em administração aguda, podem precipitar crises de pânico, delírio e psicose, em geral relacionadas a usuários inexperientes que apresentam um alto grau de apreensão ao fazer uso de uma substância ilegal como a maconha, ou em

indivíduos que já possuíam predisposição a doenças psiquiátricas dessa natureza (Annis e Smart, 1973). O uso continuado de doses altas de  $\Delta^9$ -THC pode ainda provocar um quadro de intoxicação crônica, caracterizado por apatia, letargia, morosidade, dificuldade de julgamento, problemas de concentração e memória (Tennant e Groesbeck, 1972).

As propriedades psicoativas da *Cannabis* e do  $\Delta^9$ -THC são mediadas por dois tipos de receptores canabinóides, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, embora existam evidências de, pelo menos, mais um tipo de receptor canabinóide não-CB<sub>1</sub>, não-CB<sub>2</sub> (Howlett *et al.*, 2002; Piomelli, 2003; Pertwee, 2005). Os receptores CB<sub>1</sub> foram clonados de tecidos de ratos, camundongos e humanos e apresentam uma homologia entre as espécies de 97 a 99% dos seus aminoácidos (Howlett *et al.*, 2002). Os receptores CB<sub>2</sub> possuem cerca de 50% de homologia com os receptores CB<sub>1</sub> e a estrutura de ambos é a de um receptor com domínio de sete alças transmembranares, indo ao encontro de experimentos bioquímicos e celulares que sugeriam um mecanismo de transdução de sinal via acoplamento a proteína G para os receptores canabinóides (Howlett e Fleming, 1984).

O primeiro endocanabinóide a ser caracterizado foi a etanolamina do ácido araquidônico, batizada por seu descobridor de anandamida, uma palavra derivada do sânscrito, que significa “êxtase, felicidade ou extrema alegria” (Childers e Breivogel, 1998). A anandamida se liga com afinidade moderada e é um agonista parcial dos receptores CB<sub>1</sub>, além de ser um agonista fraco dos receptores CB<sub>2</sub> (Devane *et al.*, 1992). A anandamida pertence à família das N-acil-etanolaminas, já conhecida por modular a atividade da enzima adenilato ciclase, de proteínas kinases ativadas por

mitógeno e de canais iônicos ativados por voltagem (McAllister e Glass). Outros compostos dessa família são o homo- $\gamma$ -linoleniletanolamina e o docosatetraeniletanolamida (Bisogno *et al.*, 2005). Além destes, nos últimos 10 anos outros derivados do ácido araquidônico foram identificados como endocanabinóides (ver Di Marzo *et al.*, 2004).

Atualmente, diversas potencialidades terapêuticas são propostas para o sistema canabinóide (Pertwee, 2005). Entre elas, existem relatos da eficácia dos canabinóides no controle da dor, da êmese, no alívio dos sintomas da esclerose múltipla e na regulação do apetite (Carlini, 2004; Makriyannis *et al.*, 2005). Contudo, sobre o aspecto da dependência de drogas, existe uma carência de estudos que avaliam as conseqüências do tratamento agudo e crônico de ligantes canabinóides em modelos animais do TDAH no período da adolescência.

### **1.3. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade**

Pouco se sabe sobre a origem neurobiológica do TDAH e, até o momento, a hipótese mais provável é de que alterações cerebrais no sistema monoaminérgico estejam envolvidas. Evidências clínicas, por exemplo, demonstram que inibidores da recaptção de catecolaminas, como d-anfetamina ou metilfenidato (Ritalina®), ou inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina, como os antidepressivos tricíclicos, promovem uma melhora substancial na qualidade de vida dos portadores de TDAH (Biederman e Spencer, 1999; Seeman e Madras, 1998). Por outro lado, a serotonina não

parece ter grande relevância na etiologia do TDAH, visto que o tratamento com inibidores seletivos da recaptção de serotonina promove apenas benefícios limitados nos pacientes com TDAH (Barrickman *et al*, 1991). Mais especificamente, considera-se que uma hipofunção do sistema dopaminérgico em áreas corticais, límbicas e motoras do cérebro seja a principal responsável pelas alterações comportamentais observadas nos pacientes com TDAH (Sagvolden e Sergeant, 1998).

De fato, faz bastante sentido que a dopamina esteja envolvida em uma patologia que congrega sintomas motores e cognitivos, visto que duas das principais vias dopaminérgicas no sistema nervoso central (SNC) estão envolvidas diretamente nestes processos (as vias nigro-estriatal e mesocorticolímbica, respectivamente; Sagvolden e Sergeant, 1998). Além disso, sugere-se que uma atividade aumentada dos transportadores de dopamina (Krause *et al*, 2003) ou da monoamino oxidase (MAO), a enzima responsável pela metabolização da dopamina (Stoff *et al*, 1989), poderia contribuir para a hipofunção do sistema dopaminérgico apresentada pelos portadores do TDAH. Como conseqüência provável da hipofunção deste sistema, crianças com sintomas de hiperatividade relacionados ao TDAH apresentam também uma concentração aumentada de receptores dopaminérgicos D2 no cérebro em relação aos indivíduos sadios de mesma faixa etária (Jucaite *et al*, 2005).

#### 1.4. Sistema de recompensa

Além da participação nos sintomas motores e cognitivos do TDAH, a dopamina é fundamental na neurocircuitaria do sistema de recompensa, que consiste da interconexão sináptica de neurônios da área tegmental ventral (ATV), feixe medial prosencefálico (FMP), núcleo *accumbens* (Nac), globo pálido ventral (GPV) e córtex pré-frontal medial (CPFM). Estes circuitos de recompensa estão implicados no uso e abuso de drogas, e a inibição desse circuito está envolvida nos efeitos disfóricos da retirada e da fissura (i.e. desejo compulsivo) às drogas de abuso. O núcleo *accumbens* de roedores pode ser anatomicamente subdividido em duas regiões, a porção *shell* e a *core*. A porção *shell* localiza-se mais ventralmente e está intimamente conectada com a amígdala estendida, uma estrutura composta por um conjunto de regiões límbicas situadas próximas à linha medial, responsável por respostas emocionais em humanos e roedores. A porção *core*, por sua vez, localiza-se mais dorsalmente e relaciona-se com áreas que controlam a função motora, como o estriado dorsal (Usuda *et al.*, 1998; Zahm 2000). O uso da maioria das drogas de abuso promove a ativação das células dopaminérgicas da ATV que emitem projeções ao Nac. O Nac, por sua vez, conecta-se ao GPV e a outros sítios importantes para a expressão de comportamentos relacionados à recompensa e a motivação/incentivo (Bardo, 1998; Napier e Mitrovic, 1999; McBride *et al.*, 1999). Esse sistema recebe uma extensa modulação neural, incluindo os sistemas opioidérgicos, serotoninérgicos, gabaérgicos e glutamatérgicos (para revisão ver Gardner, 1997). Recentemente o sistema canabinóide tem sido reconhecido como um

importante modulador do eixo de recompensa. Os receptores CB<sub>1</sub> estão relacionados com uma gama de mecanismos transduccionais de segundos mensageiros, como a ativação de canais de potássio e MAP quinases, e a inibição da adenilato ciclase e de canais de cálcio voltagem-dependente (Bidaut-Russell *et al.*, 1990; Henry e Chavkin, 1995; Twitchell *et al.*, 1997; Hoffman e Lupica, 2000). Os mesmos substratos que estão implicados no consumo descontrolado de substâncias podem se encontrar desregulados no TDAH (Robbins, 2002).

### **1.5. Modelos animais de TDAH**

Diversas tentativas têm sido realizadas na expectativa de se desenvolver um modelo animal que represente fielmente as particularidades do TDAH. Isto é, que mimetize as características comportamentais, tenha um perfil similar de resposta aos tratamentos farmacológicos vigentes e apresente características neurobiológicas semelhantes aos portadores deste transtorno. Até o momento, alguns modelos animais foram propostos: ratos selecionados para hiperlocomoção a partir de uma população heterogênea (Puumala *et al*, 1996), ratos expostos a toxinas ambientais (Silbergeld e Goldberg, 1974; Holene *et al*, 1998), ratos com lesões neurológicas induzidas por toxinas dopaminérgicas (Shaywitz *et al*, 1976) e, pelo menos, três modelos genéticos: Ratos Espontaneamente Hipertensos - SHR (Sagvolden, 2000), ratos Naples com alta e baixa excitabilidade (Sadile *et al.*, 1996) e camundongos com deleção gênica (*knock-out*) para o transportador de dopamina (Giros *et al*,

1996). Cada um destes modelos animais apresenta suas vantagens e desvantagens e, de certa forma, cada um deles é capaz de mimetizar algumas das características do TDAH.

Os ratos da linhagem isogênica SHR têm sido considerados um bom modelo animal e, por isso, são os mais utilizados no estudo do TDAH (Davids *et al.*, 2003). Esta linhagem foi obtida através de cruzamentos consangüíneos a partir da linhagem Wistar (Okamoto e Aoki, 1963). Os ratos SHR apresentavam fenótipo de hipertensão e, surpreendentemente, os animais apresentavam também índices aumentados de atividade locomotora quando comparados aos seus controles normotensos Wistar-Kyoto (Sagvolden, 2000). Os ratos da linhagem SHR apresentam também características neurobiológicas semelhantes às observadas em pacientes com TDAH, como uma hipofunção do sistema dopaminérgico, resultante de uma baixa liberação de dopamina (Russel *et al.*, 1995), aliada a uma atividade aumentada das enzimas de metabolização da dopamina, como a mono-amino oxidase (MAO), o que diminui a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica (Boix *et al.*, 1998). Também foram encontrados níveis aumentados de adenosina nos cérebros de ratos SHR (e nos pacientes com TDAH), juntamente a uma baixa atividade da enzima adenosina deaminase, responsável pela metabolização de adenosina, sugerindo uma possível disfunção do sistema adenosinérgico que poderia contribuir para a disfunção primária observada no sistema dopaminérgico (veja em Davies *et al.*, 1987). Além disso, os ratos SHR apresentam uma relativa diminuição na atividade locomotora e uma melhora nos déficits de aprendizado em resposta ao tratamento com metilfenidato, o que valida farmacologicamente este modelo

animal (Wultz *et al*, 1990; Sagvolden *et al*, 1992). Como consequência, os ratos SHR têm sido intensamente estudados com o objetivo de se comparar ao perfil comportamental e neurobiológico dos portadores do TDAH, visando o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas.

## 2. OBJETIVOS

---

Considerando os fatos relatados na introdução, o objetivo do presente estudo foi investigar a hipótese de que modelos animais de adolescência e do TDAH podem ser sensíveis aos efeitos relacionados à ansiedade e reforçadores de canabinóides. Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

- Comparar os efeitos do agonista canabinóide WIN 55,212-2 nos parâmetros relacionados à ansiedade e na atividade locomotora, durante a adolescência e idade adulta, em ratos Wistar e SHR no teste do campo aberto.

- Estudar os efeitos do agonista canabinóide WIN 55,212-2 nos parâmetros relacionados à ansiedade e na atividade locomotora, durante a adolescência e idade adulta, em ratos Wistar e SHR no teste do labirinto em cruz elevado.

- Investigar os efeitos do agonista canabinóide WIN 55,212-2 no desenvolvimento de reforço positivo ou aversão, durante a adolescência e idade adulta, em ratos Wistar e SHR no teste da preferência condicionada de lugar.

- Verificar os efeitos do antagonista seletivo dos receptores canabinóides do subtipo CB1 em eventuais alterações na locomoção, comportamentos relacionados à ansiedade e nas propriedades reforçadoras (ou aversivas) induzidas pelo WIN 55,212-2 durante a adolescência e idade adulta, em ratos Wistar e SHR.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1. Animais

Ratos machos, adolescentes e adultos, das linhagens SHR e Wistar foram utilizados neste estudo. A adolescência foi definida pelo período pós-natal (PN) entre 28 e 40 dias (Spear e Brake, 1983) e a idade adulta pelo período entre PN 90 e PN 100.

A colônia de ratos SHR utilizada neste estudo é originária da Universidade de Harvard (Boston, MA) sendo obtida a partir da UNESP (Botucatu, SP, Brasil) em 1999. A partir daí, os ratos SHR foram mantidos no laboratório de Genética do Comportamento da UFSC (Florianópolis, SC, Brasil) sob um sistema de acasalamento irmão/irmã como recomendado para todas as linhagens consangüíneas (ILAR, 1992). A linhagem SHR foi considerada como isogênica uma vez que os animais apresentaram uma alta homologia de DNA entre seus indivíduos (Ramos *et al.*, 1997). Para realização deste estudo as colônias de ratos SHR foram criadas e mantidas em nosso laboratório.

Já a colônia de ratos Wistar é originária da EPM/UNIFESP (São Paulo, SP, Brasil), sendo criadas e mantida no biotério central da UFSC (Florianópolis, SC, Brasil) desde de 1991. Para a realização deste estudo as colônias de ratos Wistar, considerados uma população heterogênica, foram obtidas do biotério central da UFSC.

Os animais foram desmamados e separados por sexo com quatro semanas de idade, e após isso, foram agrupados em cinco ou seis em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm), tendo livre acesso à água e à comida. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (fase clara 7:00-19:00 horas). Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas de conduta com animais experimentais do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC) número do protocolo.

### **3.2. Drogas**

Foram utilizados: o agonista de receptores canabinoide WIN 55,212-2 [R-(+)-(2,3-dihidro-5-metil-3-[[4-morfolinil] metil] pirol [1,2,3-de-]-1,4-benzoxazina-6-il) (1-naftalenil) metanone mesilato] (Tocris, USA) e o antagonista de receptores canabinoide do subtipo CB1 AM 251 [N-(piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carboxamida] (Tocris, USA). Estas drogas foram dissolvidas em 0.9% NaCl (salina) com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) mais 0.1% Tween 80. A solução controle consistiu do veículo utilizado para dissolver as drogas. Todas as doses foram selecionadas a partir de experimentos pilotos ou de estudos prévios (Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1998; Haller *et al.*, 2004).

### 3.3. Campo-aberto

O teste do campo aberto (CA) consiste de uma arena contendo uma área central aversiva e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação tanto da atividade locomotora, como de comportamentos relacionados à ansiedade. O aparelho feito de madeira coberta com fórmica impermeável, tendo assoalho branco dividido por linhas pretas em 25 quadrados (20 x 20 cm) e cercado por paredes elevadas em 40 cm de altura. Os experimentos foram conduzidos em local sob baixa intensidade luminosa (10 lux). Cada rato foi colocado no centro do CA e as seguintes variáveis foram registradas por 5 minutos: número de quadrados periféricos (adjacentes às paredes) cruzados (locomoção periférica), número de quadrados centrais (longe das paredes) cruzados (locomoção central), tempo na área central (tempo no centro), porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (locomoção periférica mais locomoção central).



**Figura 1.** Campo aberto.

### 3.4. Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE), que é baseado no conflito de roedores entre a movimentação para explorar um ambiente novo e o medo de áreas elevadas abertas, foi utilizado para mensurar comportamentos relacionados à ansiedade em ratos (Pellow *et al.*, 1985). Resumidamente, o aparelho apresentava quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, feitos de madeira coberta com fórmica impermeável elevado 52 cm do chão. Os braços fechados eram opostos e formavam uma cruz com os braços abertos, cada braço media 50 cm de comprimento e 10 cm de largura. Na interseção da cruz, formada pelos quatro braços, havia uma plataforma central (13,5 x 10 cm) que dava acesso a cada um dos braços. Cada rato foi colocado nessa plataforma com a cabeça voltada para um braço aberto. Os animais foram observados durante o período de 5 min. As porcentagem de tempo (%TA) e de entradas (%EA) foram utilizadas como índices relacionados à ansiedade. O número de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice de locomoção geral (Cruz *et al.*, 1994). A entrada em cada braço do labirinto foi registrada sempre que o animal colocava as quatro patas dentro do braço.



**Figura 2.** Labirinto em cruz elevado.

### 3.5. Preferência condicionada de lugar

A preferência condicionada de lugar (PCL) é um modelo amplamente utilizado para mensurar os efeitos reforçadores de drogas comumente abusadas por humanos, e está baseada na capacidade do animal em associar o efeito induzido pela droga com pistas ambientais.

O condicionamento de lugar e o teste da PCL foram realizados em caixas de madeira coberta com fórmica com dois compartimentos distintos de 30 X 30 X 22 cm: um branco com listras verticais pretas e chão metálico e um preto com o chão liso de madeira. Os dois compartimentos estão separados por um corredor central na cor cinza.

O paradigma da preferência condicionada de lugar consistiu de três fases: habituação e pré-condicionamento (dias 1 e 2, respectivamente), condicionamento (dias 3-10) e pós-condicionamento ou teste (dia 11) (vide item 3.6). O paradigma utilizado é conhecido como *unbiased* (i.e., sem viés), onde as condições experimentais são selecionadas para resultar em uma preferência balanceada dos animais para ambos os compartimentos durante o pré-teste. Neste sentido, os animais que permaneceram acima de 85% em um dos dois compartimentos foram excluídos do experimento. A entrada do animal em um compartimento foi definida quando ele entrou com as quatro patas esse compartimento.



**Figura 3.** Preferência condicionada de lugar.

### **3.6. Procedimentos experimentais**

Os animais, das linhagens e idades estudadas, foram tratados agudamente com WIN nas doses de 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg e 30 minutos após foram submetidos ao CA ou LCE. A ordem de exposição dos animais nos testes foi contrabalanceada. Em cada um dos testes os parâmetros analisados foram registrados durante os cinco primeiros minutos. Para verificar se os efeitos induzidos pelo WIN nesses testes são resultantes da ativação de receptores canabinóides do subtipo CB1, o tratamento com um antagonista seletivo para receptores CB1, o AM 251, foi realizado 20 minutos antes da injeção com WIN. O tratamento foi realizado pela via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 0.2 ml/100 g de peso corpóreo.

Na preferência condicionada de lugar, nos dois primeiros dias os ratos exploraram livremente por 15 min os dois compartimentos, sendo que no segundo dia o tempo gasto em cada um dos compartimentos foi registrado por 15 min (preferência basal). Na sessão de condicionamento, os ratos foram

injetados via i.p. com WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) ou AM 251 (0,25 ou 1,25 mg/kg) e, imediatamente após, confinados em um dos dois compartimentos por 25 min. Em dias alternados, os ratos receberam veículo e foram colocados no compartimento oposto. O grupo controle recebeu veículo em ambos os compartimentos. No dia do teste, os animais foram colocados no corredor central que dá acesso aos compartimentos e o tempo gasto no compartimento pareado com a droga foi registrado por 15 min. Os níveis de preferência (ou aversão) de lugar foram definidos pela comparação do tempo gasto pelos animais no compartimento pareado com a droga antes e depois do tratamento. Para analisar se os efeitos induzidos pelo WIN estão relacionados com a ativação de receptores CB1, os animais foram tratados com AM 251 (antagonista seletivo dos receptores canabinóides do subtipo CB1) 20 minutos antes da injeção de WIN.

Todos os experimentos foram conduzidos em uma sala com som e intensidade luminosa (10 lux) controlados, cada experimento foi registrado via uma câmera de vídeo posicionada acima do teste e monitorada em uma sala adjacente por um experimentador que não tinha conhecimento dos tratamentos dos animais durante a avaliação comportamental.

### **3.7. Análise estatística**

Todos os valores estão expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas dos resultados obtidos no teste do

campo aberto e do labirinto em cruz elevado foram analisadas utilizando a ANOVA de três vias, com linhagem, idade e tratamento como variáveis independentes.

Os dados do teste da preferência condicionada de lugar foram analisados utilizando a ANOVA de duas vias, com o fator tratamento e medida repetida (pré- e pós-condicionamento) como variáveis independentes, separadamente para ratos Wistar e SHR nas duas idades estudadas.

Os resultados dos experimentos utilizando o antagonista AM 251 foram analisados utilizando a ANOVA de uma via (tratamento como variável independente) para os dados registrados no teste de campo aberto, e ANOVA de duas vias (tratamento e medida repetida como variáveis independentes) para os dados do teste da preferência condicionada de lugar.

Quando significativa a ANOVA, comparações post hoc múltiplas foram realizadas utilizando o teste de Duncan. O nível de significância adotado em todos os experimentos foi  $P \leq 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Efeitos da ativação do sistema canabinóide nos parâmetros relacionados à ansiedade no teste do campo aberto em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR

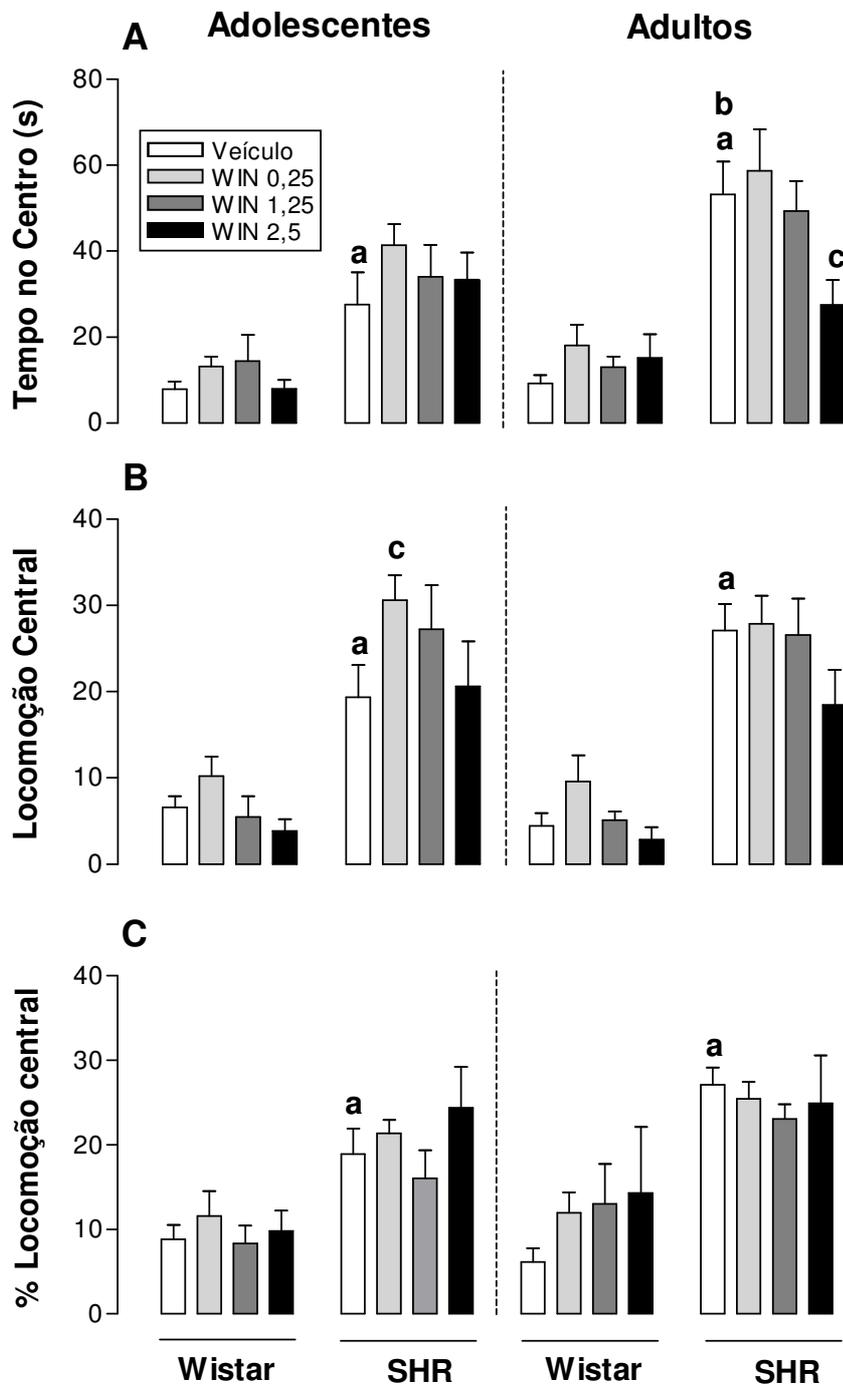
Os resultados dos efeitos da injeção intraperitoneal (i.p.) de WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR, no tempo no centro, locomoção central e no percentual de locomoção central (índices relacionados à ansiedade) no teste CA estão representados na Figura 4.

A análise de variância realizada através da ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 98,23$ ;  $P < 0,0001$ ], idade [ $F(1,114) = 7,93$ ;  $p < 0,01$ ] e para o fator tratamento [ $F(3,114) = 3,04$ ;  $P < 0,01$ ] no tempo no centro do CA. Entretanto, a análise não indicou diferenças significantes para a linhagem x idade [ $F(1,114) = 3,12$ ;  $P = 0,08$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 1,41$ ;  $P = 0,24$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,97$ ;  $P = 0,41$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 1,99$ ;  $P = 0,12$ ]. O teste de Duncan indicou que ratos da linhagem SHR, adolescentes e adultos, permaneceram significativamente mais tempo na área central aversiva do CA do que ratos da linhagem Wistar de ambas as idades. Além disso, o teste de Duncan também indicou que ratos SHR adultos permanecem mais tempo no centro do CA do que ratos adolescentes da mesma linhagem. Comparações entre os grupos revelaram que o tratamento com WIN (2,5 mg/kg) diminuiu

significativamente o tempo em que ratos SHR adultos permaneceram no centro do CA. Por outro lado, a administração de WIN (0,25; 1,25; ou 2,5 mg/kg) não alterou o tempo no centro em ratos SHR adolescentes ou em ratos Wistar (independentemente da idade) no CA (Figura 4A).

A figura 4B sumariza os efeitos da administração aguda de WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR, na locomoção central no CA. A ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 140,31$ ;  $P \leq 0,0001$ ] e para o fator tratamento [ $F(3,114) = 4,56$ ;  $P < 0,01$ ]. Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para o fator idade [ $F(1,114) = 0,03$ ;  $P = 0,87$ ] e para os fatores linhagem x idade [ $F(1,114) = 0,25$ ;  $P = 0,62$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 0,54$ ;  $P = 0,66$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,44$ ;  $P = 0,72$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,80$ ;  $P = 0,50$ ]. O teste de Duncan indicou que ratos SHR, adolescentes e adultos, apresentam uma maior locomoção na área central aversiva do CA do que ratos Wistar de ambas as idades. Ao contrário do que ocorreu com tempo de permanência no centro do CA em ratos SHR (Figura 4A), a análise mostrou que ratos adolescentes (independentemente da linhagem) não diferiram de ratos adultos na locomoção central no CA. Além disso, o tratamento com WIN (0,25 mg/kg) promoveu um aumento significativo na locomoção central de ratos SHR adolescentes no teste do CA. Porém, as demais comparações entre os grupos revelaram que o tratamento com WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) não alterou a locomoção central de ratos Wistar adolescentes ou em ratos adultos (independentemente da linhagem) no teste do CA (Figura 4B).

Na figura 4C estão expressos os efeitos da administração aguda de WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR, no percentual de locomoção central no CA. A análise de variância realizada através da ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 47,92$ ;  $P < 0,0001$ ]. Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para o fator idade [ $F(1,114) = 3,59$ ;  $P = 0,06$ ], tratamento [ $F(3,114) = 0,87$ ;  $P = 0,46$ ], linhagem x idade [ $F(1,114) = 0,85$ ;  $P = 0,36$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 0,62$ ;  $P = 0,61$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,23$ ;  $P = 0,87$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,75$ ;  $P = 0,52$ ] na porcentagem de locomoção central no CA. O teste de Duncan indicou que ratos adolescentes e adultos SHR apresentaram um maior percentual de locomoção na área central aversiva do CA do que ratos Wistar de ambas as idades. Além disso, apesar do tratamento com WIN (0,25 mg/kg) em adolescentes SHR promover um aumento significativo na locomoção central (Figura 4B), a ativação do sistema endocanabinóide não alterou os níveis relacionados à ansiedade, uma vez que o percentual de cruzamentos na área central do CA não foi alterado com o tratamento com WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) (independentemente da linhagem ou idade) (Figura 4C).



**Figura 4.** Efeitos da administração aguda do agonista canabinóide WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.) ou veículo no tempo no centro (A), locomoção central (B) e no percentual de locomoção central (C) em ratos adolescentes e adultos das linhagens Wistar e SHR no teste do CA durante 5 min. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. dos animais agrupados pela linhagem, tratamento e idade (n=8-9). <sup>a</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo de controle da linhagem Wistar da mesma idade. <sup>b</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo adolescente da mesma linhagem. <sup>c</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle da mesma linhagem e idade (ANOVA seguida do teste de Duncan).

#### **4.2. Influência do tratamento com AM 251 nos efeitos induzidos pelo WIN nos índices relacionados à ansiedade em ratos adolescentes SHR no teste do campo aberto**

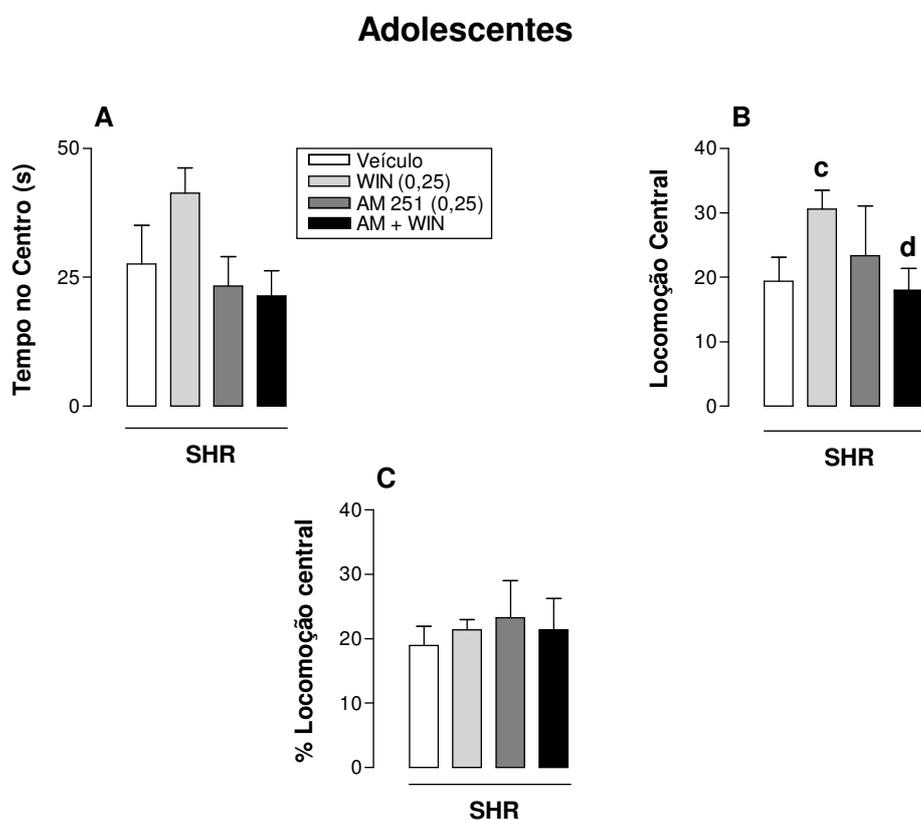
A figura 5 representa os efeitos do tratamento agudo com veículo, WIN (0,25 mg/kg, i.p.) e/ou AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes SHR no tempo no centro, locomoção central e no percentual de locomoção central no teste do CA.

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento no tempo no centro [ $F(3,27) = 3,60$ ;  $P < 0,05$ ] no teste do CA. Entretanto, o teste de Duncan mostrou que o tratamento com WIN e/ou AM 251 não alterou o tempo de permanência na área central aversiva do teste CA em comparação ao controle (Figura 5A).

Além disso, a análise mostrou que o fator tratamento promoveu diferenças significantes na locomoção central de ratos SHR adolescentes [ $F(3,27) = 6,61$ ;  $P < 0,01$ ]. Comparações entre os grupos revelaram que, como mencionado anteriormente (Figura 4B), o tratamento com WIN (0,25 mg/kg, i.p.) aumenta o número de quadrados cruzados na área central do CA de ratos SHR adolescentes. Por outro lado, a injeção de AM 251 (0,25 mg/kg) não alterou a locomoção central dos animais. E o tratamento prévio (20 min antes) com AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) bloqueou o aumento da locomoção central induzida pelo WIN em ratos SHR adolescentes no CA (Figura 5B).

A ANOVA de uma via não revelou efeito significativo para o fator tratamento no percentual de locomoção central [ $F(3,27) = 2,13$ ;  $P=0,12$ ] no teste do CA. (Figura 5C).

O conjunto de resultados representados na figura 5 sugere que a ativação ou bloqueio do sistema endocanabinóide não altera os níveis relacionados à ansiedade, uma vez que o percentual de cruzamentos na área central do CA não foi alterado com o tratamento com WIN (0,25 mg/kg) e/ou AM 251 (0,25 mg/kg).

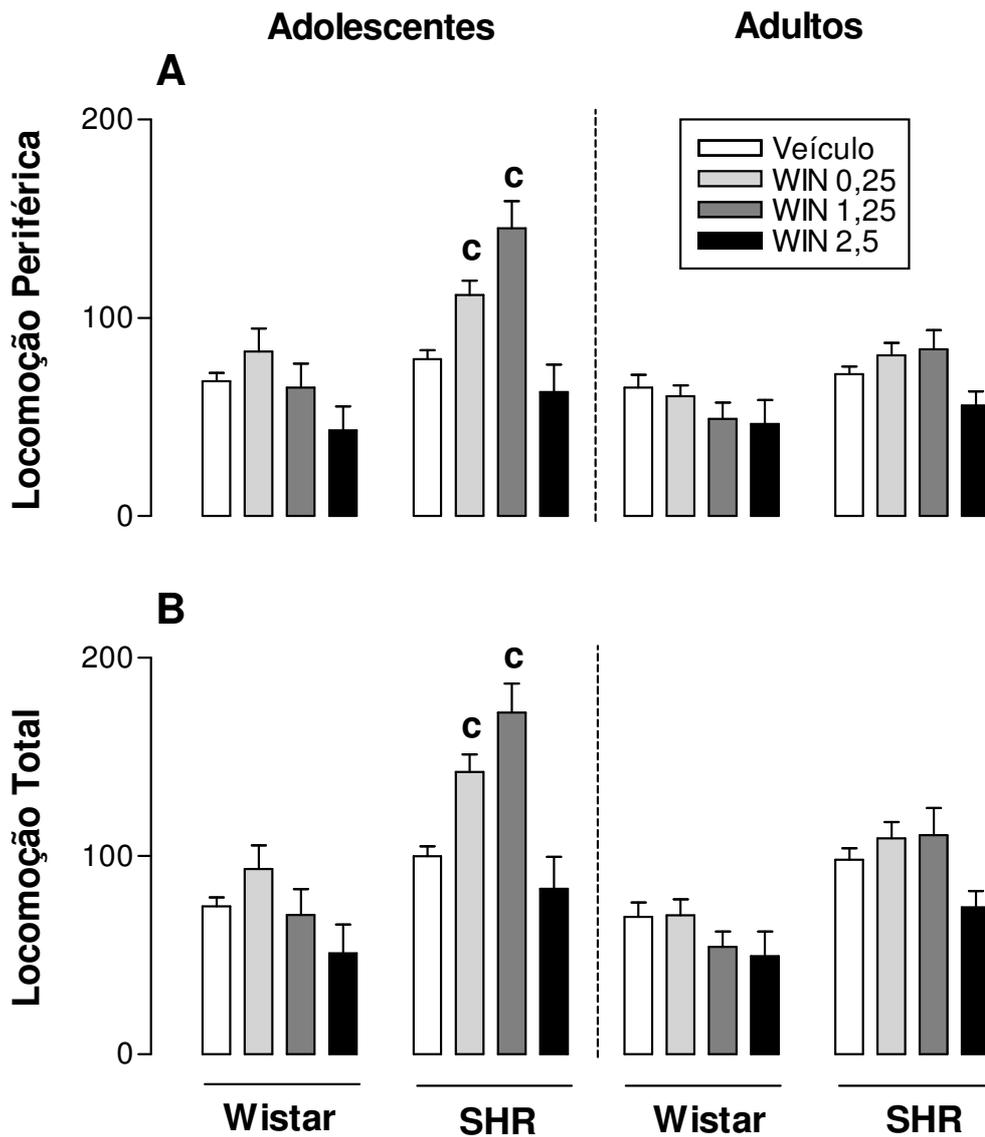


**Figura 5.** Efeitos da administração aguda de WIN (0,25 mg/kg, i.p.), AM 251 (0,25 mg/kg) ou veículo no tempo no centro (A), locomoção central (B) e no percentual de locomoção central (C) em ratos adolescentes SHR no teste do CA (5 min). As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. ( $n=8-9$ ).<sup>c</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle. <sup>d</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo tratado com WIN (0,25 mg/kg) (ANOVA seguida do teste de Duncan).

### **4.3. Efeitos da ativação do sistema canabinóide na atividade locomotora no teste do campo aberto em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR**

A figura 6 mostra os efeitos da administração aguda de WIN (0,25; 1,25; 2,5 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR, na locomoção periférica e na locomoção total no CA.

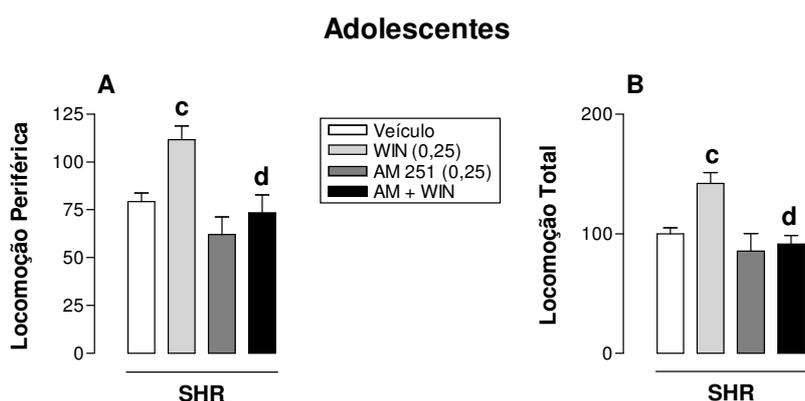
Na figura 6A, a ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 32,32$ ;  $P < 0,0001$ ], idade [ $F(1,114) = 15,16$ ;  $P < 0,001$ ], tratamento [ $F(3,114) = 11,19$ ;  $P < 0,0001$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 5,59$ ;  $P < 0,005$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 3,53$ ;  $P < 0,05$ ]. Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para a interação linhagem x idade [ $F(1,114) = 3,35$ ;  $P = 0,07$ ] ou entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 1,05$ ;  $P = 0,37$ ] na locomoção periférica no CA (Figura 6A). Da mesma maneira, na figura 6B a análise revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 70,08$ ;  $P < 0,0001$ ], idade [ $F(1,114) = 12,68$ ;  $P < 0,001$ ], tratamento [ $F(3,114) = 11,54$ ;  $P < 0,0001$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 5,22$ ;  $P < 0,005$ ]. Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para a interação entre os fatores linhagem x idade [ $F(1,114) = 1,97$ ;  $P = 0,16$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 2,66$ ;  $P = 0,05$ ] ou para a interação entre linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 1,00$ ;  $P = 0,59$ ] na locomoção total. O teste de Duncan indicou que apesar de ratos Wistar e SHR não diferirem na locomoção periférica e total, estes parâmetros foram seletivamente aumentados em ratos SHR adolescentes pela injeção aguda de WIN nas doses de 0,25 e 1,25 mg/kg.



**Figura 6.** Efeitos da administração aguda do agonista canabinóide WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.) ou veículo na locomoção periférica (A) e na locomoção total (B) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR, no teste do campo aberto durante 5 min. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. dos animais agrupados pela linhagem e tratamento (n=8-9).<sup>c</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo controle da mesma linhagem e idade (ANOVA seguida do teste de Duncan).

#### 4.4. Influência da administração de AM 251 na estimulação locomotora induzida pelo WIN em ratos adolescentes SHR no teste do campo aberto

Na figura 7 estão expressos os dados da administração aguda de veículo, WIN (0,25 mg/kg, i.p.), e/ou AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes SHR na locomoção periférica e total no CA. A análise realizada pela ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na locomoção periférica [ $F(3,27) = 7,52; P < 0,001$ ] e na locomoção total [ $F(3,27) = 8,89; P < 0,001$ ] no teste do CA. O teste de Duncan mostrou que, além da estimulação locomotora induzida pelo WIN (0,25 mg/kg, i.p.), uma dose ineficaz por si do antagonista seletivo CB1 AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) antagonizou o efeito do WIN na locomoção periférica (Figura 7A) e total (Figura 7B) de ratos adolescentes SHR no CA, o que sugere que essa estimulação locomotora está relacionada com a ativação de receptores canabinóides do subtipo CB1.



**Figura 7.** Efeitos da administração aguda de veículo, WIN (0,25 mg/kg, i.p.) e/ou AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) na locomoção periférica (A) e na locomoção total (B) em ratos SHR adolescentes no teste do CA durante 5 min. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. (n=8-9). <sup>c</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo

controle. <sup>d</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo tratado com WIN (0,25 mg/kg) (ANOVA seguida do teste de Duncan).

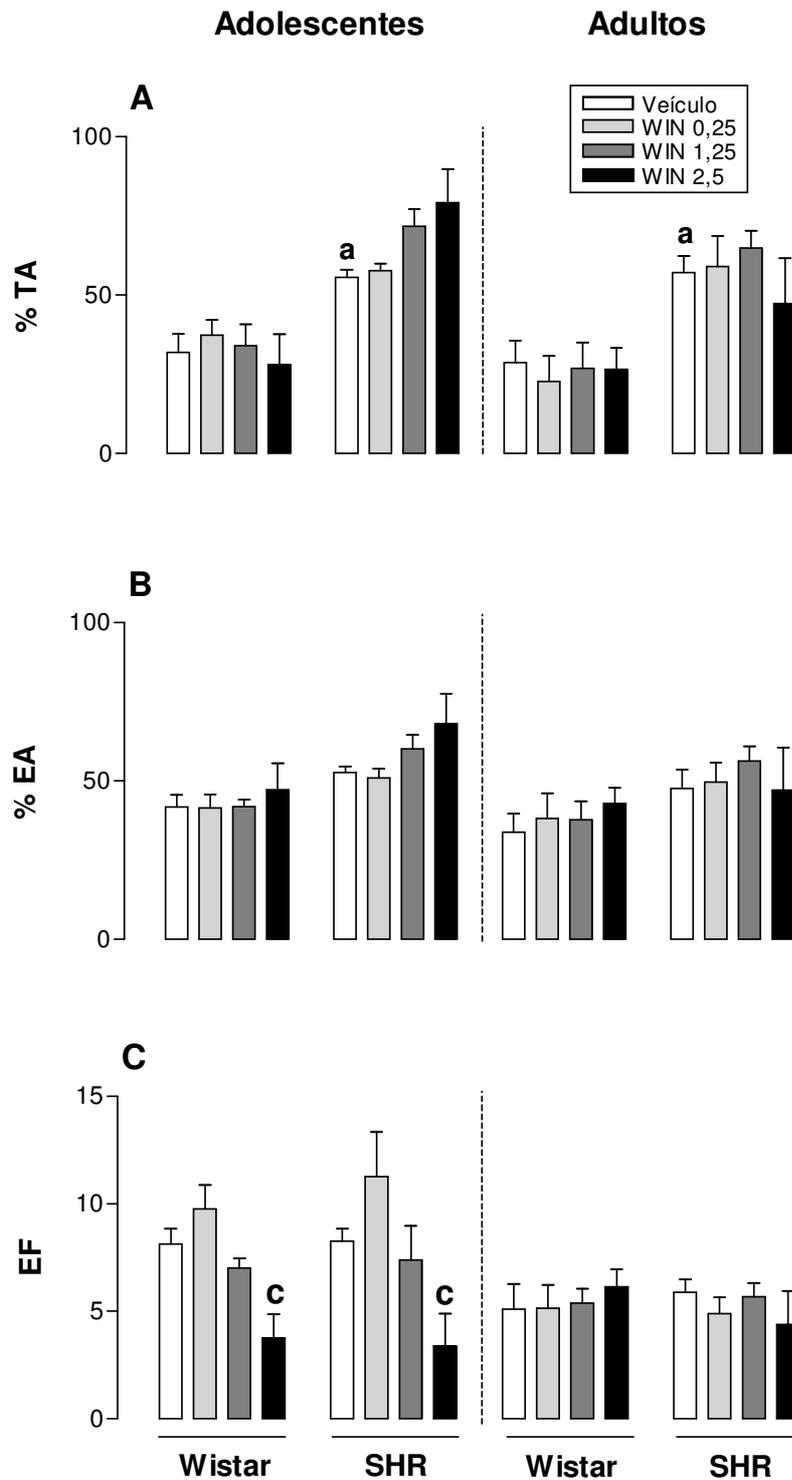
#### **4.5. Efeitos da ativação do sistema canabinoide nos índices relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR**

A figura 8 mostra os efeitos da administração aguda (i.p.) de WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg) em parâmetros comportamentais de ratos adolescentes e adultos, das linhagens Wistar e SHR, no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). A ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) revelou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 71,23$ ;  $P < 0,0001$ ] e idade [ $F(1,114) = 4,27$ ;  $P < 0,05$ ] na porcentagem de tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos (%TA). Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para o fator tratamento [ $F(3,114) = 0,50$ ;  $P = 0,60$ ], linhagem x idade [ $F(1,114) = 0,09$ ;  $P = 0,76$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 0,57$ ;  $P = 0,63$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,74$ ;  $P = 0,53$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 1,66$ ;  $P = 0,18$ ] na %TA. O teste de Duncan indicou que ratos adolescentes e adultos SHR apresentaram um aumento na porcentagem de tempo nos braços abertos quando comparados aos ratos Wistar do grupo controle (independentemente da idade) (figura 8A).

A ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) indicou um efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 17,57$ ;  $P < 0,0001$ ] na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EA). Entretanto, a análise

não indicou efeito significativo para o fator idade [ $F(1,114) = 3,91$ ;  $P=0,05$ ], tratamento [ $F(3,114) = 1,14$ ;  $P=0,34$ ], linhagem x idade [ $F(1,114) = 0,19$ ;  $P=0,66$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 0,28$ ;  $P=0,84$ ], idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,50$ ;  $P=0,69$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,51$ ;  $P=0,68$ ] na %EA (figura 8B).

A ANOVA de três vias (linhagem x idade x tratamento) mostrou um efeito significativo para o fator idade [ $F(1,114) = 13,29$ ;  $P<0,001$ ], tratamento [ $F(3,114) = 6,26$ ;  $P<0,001$ ] e da interação idade x tratamento [ $F(3,114) = 6,92$ ;  $P<0,001$ ] no número de entradas nos braços fechados (EF). Entretanto, a análise não indicou efeito significativo para o fator linhagem [ $F(1,114) = 0,02$ ;  $P=0,88$ ], linhagem x idade [ $F(1,114) = 0,33$ ;  $P=0,57$ ], linhagem x tratamento [ $F(3,114) = 0,47$ ;  $P=0,70$ ] ou para a interação entre os fatores linhagem x idade x tratamento [ $F(3,114) = 0,25$ ;  $P=0,86$ ] na EF (um índice de atividade locomotora). O teste de Duncan indicou que a maior dose de WIN avaliada (2,5 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente o número de entradas nos braços fechados de ratos adolescentes, tanto para a linhagem Wistar como para a SHR, no LCE (figura 8C).



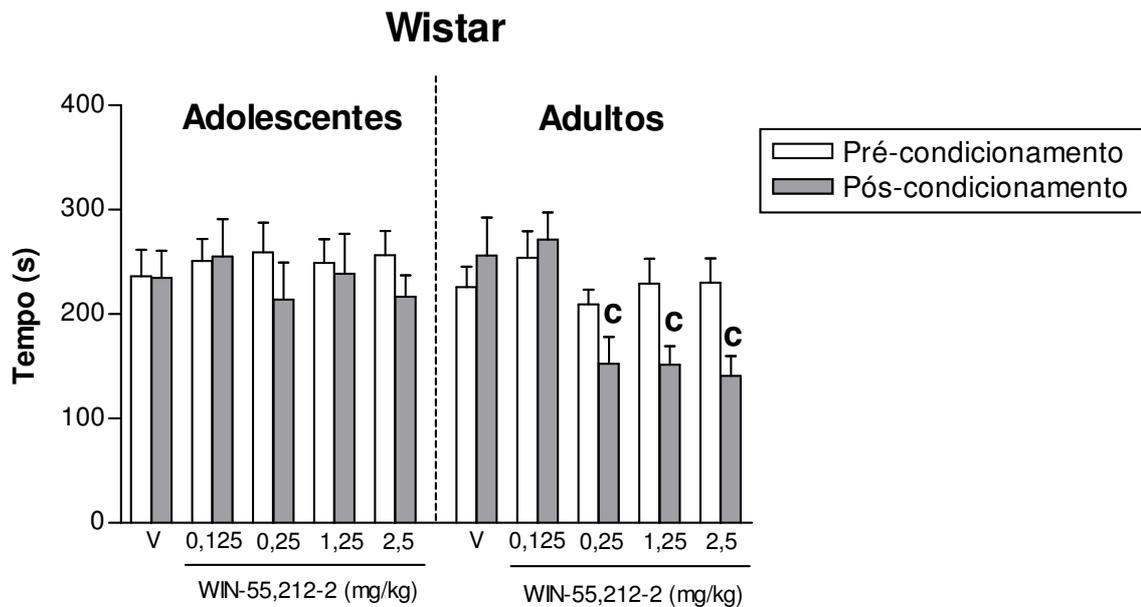
**Figura 8.** Efeitos da injeção aguda de WIN (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.) ou veículo na porcentagem de tempo nos braços abertos (A), na porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e no número de entradas nos braços fechados (C) em ratos adolescentes e adultos, Wistar e SHR no LCE (5 min). As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. <sup>a</sup> $P \leq 0.05$  em comparação ao grupo de controle da linhagem Wistar da mesma idade. <sup>c</sup> $P \leq 0.05$  em comparação ao grupo controle da mesma linhagem e idade (ANOVA seguida do teste de Duncan).

#### **4.6. Propriedades reforçadoras ou aversivas da ativação do sistema canabinoide avaliadas no teste da preferência condicionada de lugar em ratos adolescentes e adultos da linhagem Wistar**

A figura 9 ilustra os resultados dos efeitos do tratamento com WIN (0,125; 0,25; 0,125 ou 2,5 mg/kg) ou veículo, em ratos adolescentes e adultos da linhagem Wistar, no tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle) ou WIN, antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) da sessão de condicionamento na preferência condicionada de lugar (PCL).

Em ratos adolescentes da linhagem Wistar, a ANOVA de duas vias (tratamento x medida repetida) não revelou diferenças significantes para o fator tratamento [ $F(4,38) = 0,10$ ;  $P=0,98$ ], fator de repetição [ $F(1,38) = 2,03$ ;  $P=0,16$ ] ou interação entre os dois fatores [ $F(4,38) = 0,63$ ;  $P=0,65$ ].

Em ratos Wistar adultos, a ANOVA de duas vias (tratamento x medida repetida) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(4,41) = 3,41$ ;  $P<0,05$ ], repetição [ $F(1,41) = 9,79$ ;  $P<0,01$ ] e para a interação entre os fatores [ $F(4,41) = 4,76$ ;  $P<0,01$ ]. O teste de Duncan indicou que o tratamento com WIN nas doses de 0,25 – 2,5 mg/kg induziu aversão de lugar, verificada pela diminuição significativa do tempo de permanência no compartimento pareado com WIN em ratos adultos da linhagem Wistar na PCL (Figura 9).



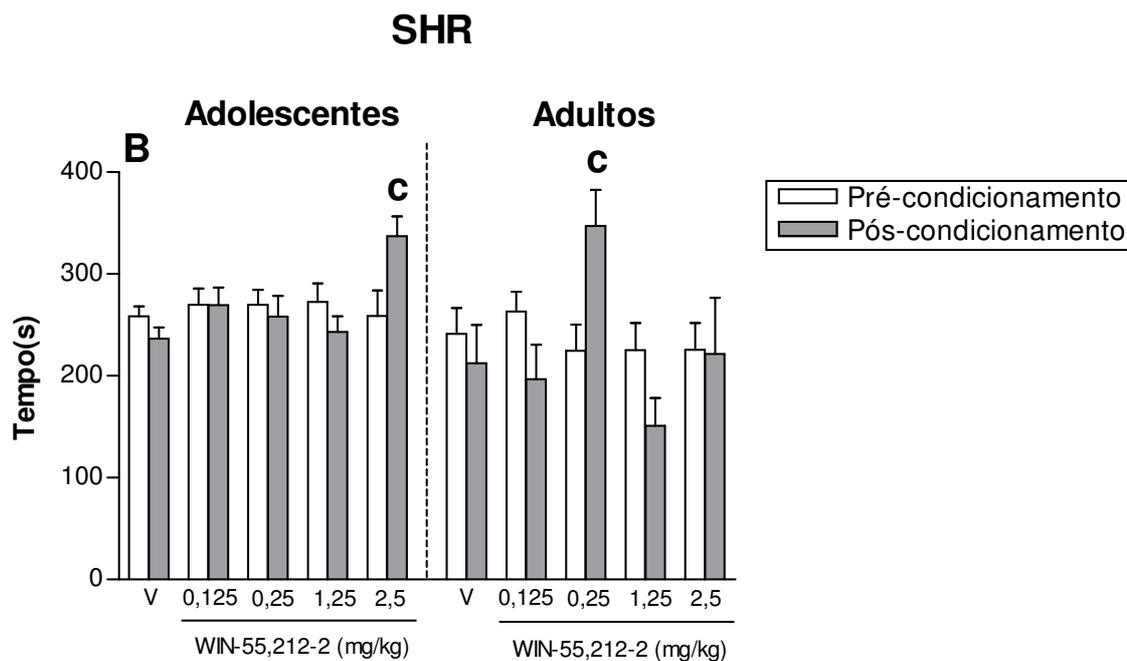
**Figura 9.** Efeitos do tratamento com veículo ou WIN na PCL em ratos adolescentes e adultos da linhagem Wistar (n=8-10). As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. do tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle) ou WIN antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) do condicionamento. <sup>c</sup>p<0,05 quando comparados ao pré-condicionamento do respectivo grupo (ANOVA seguida do teste de Duncan).

#### 4.7. Propriedades reforçadoras ou aversivas da ativação do sistema canabinoide avaliadas no teste da preferência condicionada de lugar em ratos adolescentes e adultos da linhagem SHR

Os efeitos da administração de veículo ou WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg), em ratos adolescentes e adultos da linhagem SHR, no tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle) ou WIN na PCL pode ser visto na figura 10.

Em ratos adolescentes da linhagem SHR, a ANOVA não indicou efeito significativo para o fator tratamento [ $F(4,40) = 1,71; P=0,17$ ] e repetição [ $F(1,40) = 0,12; P=0,74$ ]. Entretanto, a análise indicou diferenças significantes para a interação entre os fatores tratamento e medida repetida [ $F(4,40) = 4,14; P<0,01$ ]. O teste de Duncan indicou que o tratamento WIN induziu uma aquisição do comportamento de preferência condicionada de lugar, verificado pelo aumento significativo no tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com a dose 2,5 mg/kg de WIN, quando comparado com o grupo controle (Figura 10).

Para ratos adultos da linhagem SHR, a ANOVA não indicou efeito significativo para os fatores tratamento [ $F(4,34) = 2,32; P=0,08$ ] e repetição [ $F(1,34) = 0,24; P=0,63$ ]. Entretanto, a análise revelou diferenças significantes na interação entre os fatores tratamento e repetição [ $F(4,34) = 3,08; P<0,05$ ]. O teste de Duncan indicou que o tratamento com WIN (0,25 mg/kg) em ratos SHR adultos promove significativa preferência condicionada de lugar quando comparado ao grupo controle, indicando a propriedade reforçadora do WIN, especificamente nestas doses e linhagem avaliadas (Figura 10).



**Figura 7.** Efeito do tratamento com veículo ou WIN na PCL em ratos adolescentes e adultos da linhagem SHR (n=8-10). As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. do tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle) WIN antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) do condicionamento. <sup>c</sup>P<0,05 quando comparados ao pré-condicionamento do respectivo grupo (ANOVA seguida do teste de Duncan).

O conjunto de resultados obtidos na PCL indica que ratos adolescentes, de ambas as linhagens, apresentaram diferentes respostas reforçadoras ou aversivas pela ativação do sistema endocanabinóide. Em ratos Wistar, o tratamento com WIN (0,125; 0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.) não alterou a preferência de lugar em ratos adolescentes, mas produziu aversão de lugar em ratos adultos (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.). Já nos ratos SHR adolescentes, houve aquisição do comportamento de preferência condicionada de lugar somente com a maior dose de WIN testada (2,5 mg/kg);

e em ratos adultos, a dose de 0,25 mg/kg de WIN causou significativa preferência condicionada de lugar.

#### **4.8. Influência do tratamento com AM 251 nas propriedades reforçadoras ou aversivas induzidas pelo WIN no teste da preferência condicionada de lugar**

Na figura 11 estão ilustrados os efeitos da administração de veículo, AM (0,25 ou 1,25 mg/kg, i.p.) e/ou WIN (0,25; ou 2,5 mg/kg), em ratos Wistar e SHR, no tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle), AM, WIN ou associação AM com WIN na preferência condicionada de lugar.

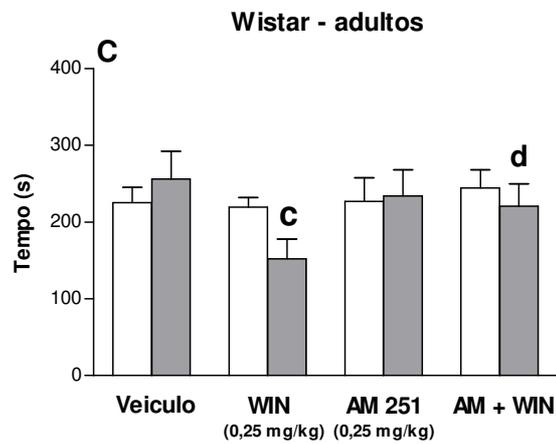
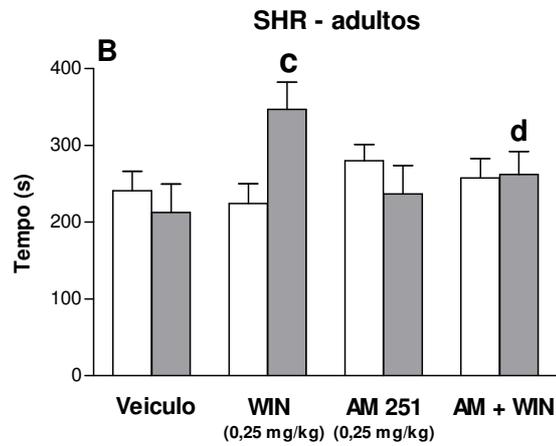
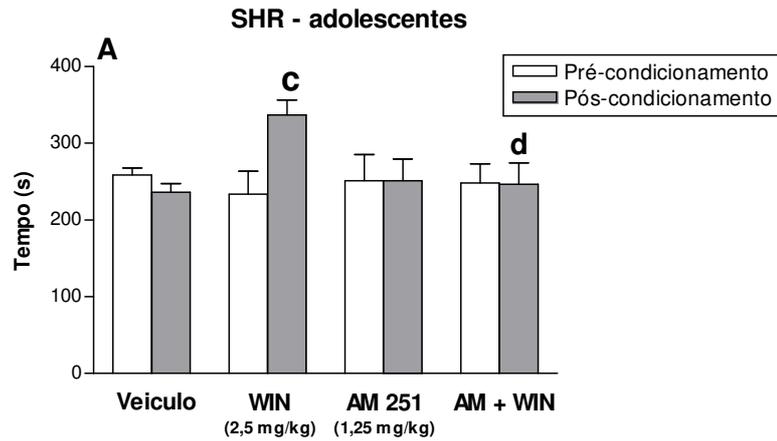
Em ratos adolescentes da linhagem SHR, a análise feita pela ANOVA de duas vias (tratamento e medida repetida) não mostrou efeito significativo para o fator tratamento [ $F(3,27) = 0,94$ ;  $P=0,43$ ] e repetição [ $F(1,27) = 1,71$ ;  $P=0,20$ ]. Entretanto, a análise indicou diferenças significantes para a interação entre os fatores tratamento e medida repetida [ $F(3,27) = 3,52$ ;  $P<0,05$ ]. O teste de Duncan indicou que o tratamento com WIN (2,5 mg/kg, i.p.), como mostrado na Figura 10, aumentou significativamente o tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com WIN após a sessão de condicionamento. Além disso, o tratamento com o antagonista dos receptores CB1 (AM 251) não alterou o comportamento de preferência na dose de 1,25 mg/kg (i.p.), mas bloqueou a aquisição de preferência condicionada ao lugar

induzida pelo WIN (2,5 mg/kg, i.p.) em ratos adolescentes SHR no teste da PCL (Figura 11A).

Da mesma maneira, em ratos SHR adultos a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes para o fator tratamento [ $F(3,26) = 1,15$ ;  $P=0,35$ ] ou medida repetida [ $F(1,26) = 0,47$ ;  $P=0,50$ ]. Entretanto, a análise indicou diferenças significantes entre a interação dos fatores tratamento e medida repetida [ $F(3,26) = 3,54$ ;  $P<0,05$ ]. O teste de Duncan indicou que, além da preferência de lugar induzida pelo WIN (0,25 mg/kg, i.p.) vista na Figura 10, a administração de AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.), que por si não produziu efeito, 20 min antes do tratamento com WIN (0,25 mg/kg, i.p.) impediu a aquisição do comportamento de preferência ao lugar em ratos adultos SHR induzida pelo WIN na PCL (Figura 11B).

Para ratos Wistar adultos, a ANOVA não indicou diferenças para o fator tratamento [ $F(3,29) = 1,22$ ;  $P=0,32$ ] ou repetição [ $F(1,29) = 1,14$ ;  $P=0,29$ ]. Entretanto, a análise indicou diferenças significantes para a interação tratamento e repetição [ $F(3,27) = 3,32$ ;  $P<0,005$ ]. O teste de Duncan revelou que a administração de WIN (0,25 mg/kg, i.p.) causou aversão de lugar em ratos Wistar adultos na PCL, vista pela significativa redução do tempo de permanência no compartimento pareado com WIN após a sessão de condicionamento. Além disso, a administração de AM 251 (0,25 mg/kg, i.p.) não alterou o tempo de permaneceu no compartimento após o condicionamento. Porém, a administração prévia de AM 251 (20 min antes da injeção de WIN) impediu a aquisição da aversão ao lugar em ratos adultos Wistar induzidas pelo tratamento com WIN (0,25 mg/kg, i.p.) na PCL (Figura 11C).

Esses resultados mostram que ambos, aversão e efeito de reforço, estão relacionados com a ativação de receptores canabinóides do subtipo CB1 em ratos.



**Figura 11.** Efeito do tratamento com veículo, AM 251 (0,25 ou 1,25 mg/kg, i.p.) e/ou WIN (0,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.) na PCL em ratos Wistar e SHR (n=8-10). As barras representam a média e as linhas verticais o E.P.M. do tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com veículo (V: grupo controle), AM 251, WIN ou associação de WIN com AM antes (pré-condicionamento) e depois (pós-condicionamento) do condicionamento. <sup>c</sup> $P < 0,05$  quando comparados ao pré-condicionamento do respectivo grupo. <sup>d</sup> $P \leq 0,05$  em comparação ao grupo tratado com WIN da mesma linhagem e idade (ANOVA seguida do teste de Duncan).

## 5. DISCUSSÃO

---

Os resultados do presente estudo mostram que a administração sistêmica de um agonista canabinóide causa diferentes respostas comportamentais dependendo da idade e linhagem dos animais. Ratos SHR adolescentes, um modelo animal validado do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), apresentaram alta sensibilidade para a hiperlocomoção induzida pela ativação do sistema endocanabinóide com baixas doses de WIN. Além disso, este estudo também demonstra pela primeira vez que o tratamento com um agonista canabinóide induz propriedades reforçadoras em ratos SHR adolescentes e adultos; mas não altera os comportamentos relacionados à ansiedade. De maneira que a adolescência em animais SHR, que apresentam comportamentos relacionados ao TDAH aumenta a sensibilidade aos canabinóides em modelos que avaliam o potencial de abuso de drogas. O presente estudo mostra ainda que o tratamento com AM 251 bloqueou tanto a estimulação locomotora como os efeitos reforçadores em ratos SHR, e aversivos em ratos Wistar, induzidos pelo WIN; demonstrando que esses efeitos estão relacionados com a ativação dos receptores canabinóides do subtipo CB1.

A adolescência está frequentemente associada com elevados níveis de busca ao prazer, agitação e comportamentos de risco, bem como a alterações na esquivas do perigo e ansiedade (Arnett, 1992). O desenvolvimento de circuitos encefálicos envolvidos na motivação e na tomada de decisões torna essa fase da vida criticamente vulnerável para o desenvolvimento de

transtornos neuropsiquiátricos, como o TDAH, ansiedade e a dependência às drogas (Chamber *et al.*, 2003). Além disso, tem sido demonstrado que crianças diagnosticadas com TDAH apresentam maiores riscos de abuso de drogas ilícitas durante a adolescência e idade adulta do que crianças sem TDAH (para revisão ver Sullivan e Rudnik-Levin, 2001; Schubiner, 2005).

Modelos animais podem fornecer uma importante perspectiva para essa questão. As características de roedores adolescentes os tornam um bom modelo para o estudo de transtornos neuropsiquiátricos com início na infância e adolescência, incluindo o TDAH e a dependência a drogas. Visto que o período da adolescência nos seres humanos e em primatas não humanos se estende por diversos anos, os modelos com roedores nessa fase do desenvolvimento são limitados aos 7-10 dias que precedem à puberdade (aproximadamente 40 dias de idade) e dos primeiros poucos dias depois disso (Spear e Brake, 1983). A adolescência nos roedores vem sendo largamente estudada como um período ontogênico crítico para a auto-administração e sensibilidade aumentada aos efeitos comportamentais de diferentes drogas como a nicotina, etanol, cocaína e delta<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Adriani e Laviola, 2004; Barron *et al.*, 2005; Caster *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2006). Porém, apesar da alta prevalência de TDAH entre adolescentes, os estudos que avaliam o potencial de abuso de drogas, utilizando ratos SHR como modelo de TDAH, foram principalmente realizados com animais adultos; onde pode ser vista uma sensibilidade aumentada para os efeitos de psicoestimulantes (Amini *et al.*, 2004) e consumo de álcool (Da Silva *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente na introdução, a cannabis é a droga ilícita mais extensamente consumida no mundo e freqüentemente o seu uso começa durante a adolescência (Crowley *et al.*, 1998). No presente estudo, a ativação do sistema canabinóide com baixas doses de um agonista canabinóide estimulou seletivamente a atividade locomotora de ratos SHR adolescentes expostos a um ambiente novo. Embora neste estudo não fosse possível determinar os mecanismos e o local exatos desta ação estimulante do WIN na atividade locomotora de ratos SHR adolescentes, o aumento da liberação de dopamina pelos canabinóides pode representar uma possibilidade de explicação.

Estudos *in vivo* (Meschler e Howlett, 2001) e *in vitro* (Szabo *et al.*, 1999) apontam para uma regulação da sinalização dopaminérgica no estriado pelos receptores CB1. Além disso, os antagonistas de receptores canabinóides aumentam a ativação locomotora induzida por agonistas dopaminérgicos, enquanto que agonistas canabinóides parecem atenuar os efeitos psicomotores induzido por agonistas da dopamina (Ferrari *et al.*, 1999; Giuffrida *et al.*, 1999; Masserano *et al.*, 1999; Hayase *et al.*, 2001). Estudos prévios sugerem que a atividade do sistema dopaminérgico nigroestriatal está alterada no cérebro de ratos SHR, com redução da liberação de dopamina no estriado (Russel *et al.*, 1995) e um aumento na renovação de dopamina estriatal (McKeon e Hendley, 1988). A expressão de receptores D2 da dopamina também está elevada no estriado de ratos SHR (Chiu *et al.*, 1982), sugerindo que a inibição da liberação de DA no estriado de ratos SHR se deve a um aumento do número de auto-receptores D2 de dopamina. Conseqüentemente, essas alterações no sistema dopaminérgico podem ser

responsáveis pela alta sensibilidade apresentada por ratos SHR para a hiperlocomoção induzida por drogas estimulantes (Tsai e Lin, 1988) e com a sensibilidade aumentada para os efeitos do WIN observada em ratos SHR adolescentes.

Uma variedade de modelos animais, como a preferência condicionada de lugar, a auto-administração e procedimentos de re-estabelecimento, são utilizados para investigar as propriedades reforçadoras de drogas comumente abusadas (veja Gardner, 2002, 2005). Além disso, a atividade de roedores em ambientes novos, que presumivelmente está relacionada à busca pela novidade em humanos, é um dos fatores mais estudados que pode prever a auto-administração de drogas (Klebaur 2001; Nadal *et al.*, 2002). De modo que a atividade locomotora e a aquisição de preferência condicionada de lugar representam medidas comumente utilizadas para avaliar os efeitos reforçadores de diferentes drogas.

Diversos estudos mostram dificuldades em avaliar as propriedades reforçadoras de canabinóides sintéticos ou do  $\Delta^9$ -THC em roedores e primatas (Corcoran e Amit, 1974; Leite e Carlini, 1974; Harris *et al.*, 1974; Van Ree *et al.*, 1978; Takahashi e Singer, 1979; Mansbach *et al.*, 1994). Várias possibilidades foram apontadas para tentar explicar esse fato. Uma delas é que o  $\Delta^9$ -THC não causa auto-administração em virtude da demora e duração de seus efeitos que pode perdurar por até 48 horas após uma injeção aguda, dependendo da espécie estudada. Outra possibilidade atribuí ao  $\Delta^9$ -THC pouca capacidade de causar dependência, ou ainda, que os efeitos aversivos podem ser predominantes a ponto de mascarar as propriedades reforçadoras

necessárias para o paradigma da auto-administração (Valjent e Maldonado, 2000).

Neste estudo, o tratamento com uma ampla faixa de dose de um agonista canabinóide causou aversão de lugar em ratos Wistar adultos. Em concordância com esses achados, estudos prévios mostraram propriedades aversivas de canabinóides em modelos animais. Os resultados de McGregor e colaboradores (1996) mostram que o (-)-cis-3-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetilheptil)phenil]-trans-4-(3-hidroxipropil) ciclohexanol (CP 55,940), um potente agonista de receptores canabinóides do subtipo CB1, induz aversão em ratos Wistar avaliados na PCL. Ratos da linhagem Sprague-Dawley tratados com  $\Delta^9$ -THC também apresentam aversão ao lugar em altas doses, enquanto que baixas doses não causaram efeito no paradigma sem viés da PCL (Sañudo-Pena *et al.*, 1997). Ao contrário dessas evidências, os resultados de Martellotta e colaboradores (1998) indicam que a auto-administração intravenosa do agonista canabinóide WIN por camundongos ocorre em função da concentração da droga. Assim, na de 0,1 mg/kg por infusão o WIN promove efeito de reforço positivo, enquanto que a dose mais elevada de 0,5 mg/kg produz aversão.

Entretanto, estudos relatam (Tanda *et al.*, 2000) e confirmam (Justinova *et al.*, 2003) que a auto-administração sustentada de  $\Delta^9$ -THC em primatas e aquisição de preferência condicionada de lugar (Lepore *et al.*, 1995) induzida pelo  $\Delta^9$ -THC em ratos. Braida *et al.* (2004) utilizaram uma ampla faixa de doses de  $\Delta^9$ -THC (0,015 – 6,00 mg/kg, i.p.) para avaliar suas propriedades reforçadoras na PCL em ratos Wistar, a administração de  $\Delta^9$ -THC (0,075; 0,15; 0,37 ou 0,75 mg/kg, i.p.) produziu significativa preferência condicionada

de lugar; enquanto que a maior dose (6,00 mg/kg, i.p.) causou efeitos aversivos e as doses intermediárias não produziram efeito. Embora não existam estudos prévios na literatura que avaliam as propriedades reforçadoras e relacionadas à ansiedade induzidas por canabinóides em animais adolescentes, o presente estudo fornece a evidência que a ativação do sistema canabinóide, em doses de WIN que causaram aversão em ratos Wistar adultos (0,25; 1,25 ou 2,5 mg/kg, i.p.), não produziu efeito de reforço, aversão ou em comportamentos relacionados à ansiedade em ratos Wistar. Além disso, a menor dose de WIN aqui usada (0,25 mg/kg, i.p.) induziu a uma significativa preferência de lugar em SHR adultos; e em ratos adolescentes, a administração da maior dose testada de WIN (2,5 mg/kg, i.p.) causou preferência ao lugar no paradigma da PCL. É importante destacar que o protocolo da PCL utilizado no presente estudo foi o mesmo para ratos adolescentes e adultos de ambas as linhagens testadas.

Certamente, deve-se considerar que a ampla variedade de protocolos de condicionamento de lugar que foram utilizados pode interferir nos resultados encontrados na literatura. Mudanças no protocolo do modelo da PCL também podem revelar os efeitos reforçadores de canabinóides. Como comentado anteriormente, o efeito aversivo do  $\Delta^9$ -THC pode mascarar suas propriedades reforçadoras. Com o intuito de excluir esses eventuais efeitos aversivos induzidos pela primeira injeção de  $\Delta^9$ -THC, Valjent e Maldonado (2000) administraram  $\Delta^9$ -THC em camundongos, mantendo-os em suas gaiolas, 24 horas antes de iniciar os procedimentos da preferência condicionada de lugar. Esses autores mostram que no mesmo paradigma em que a injeção de  $\Delta^9$ -THC promoveu aversão de lugar, foi possível com uma

única injeção prévia de  $\Delta^9$ -THC promover uma significativa preferência condicionada de lugar. Esses dados sugerem que o paradigma do condicionamento de lugar é uma medida efetiva para avaliar efeito reforçador de drogas, podendo ser utilizado para ratos adolescentes e adultos. Além disso, esse paradigma é bastante sensível às diferenças da medida de reforço de diversas drogas de abuso (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006).

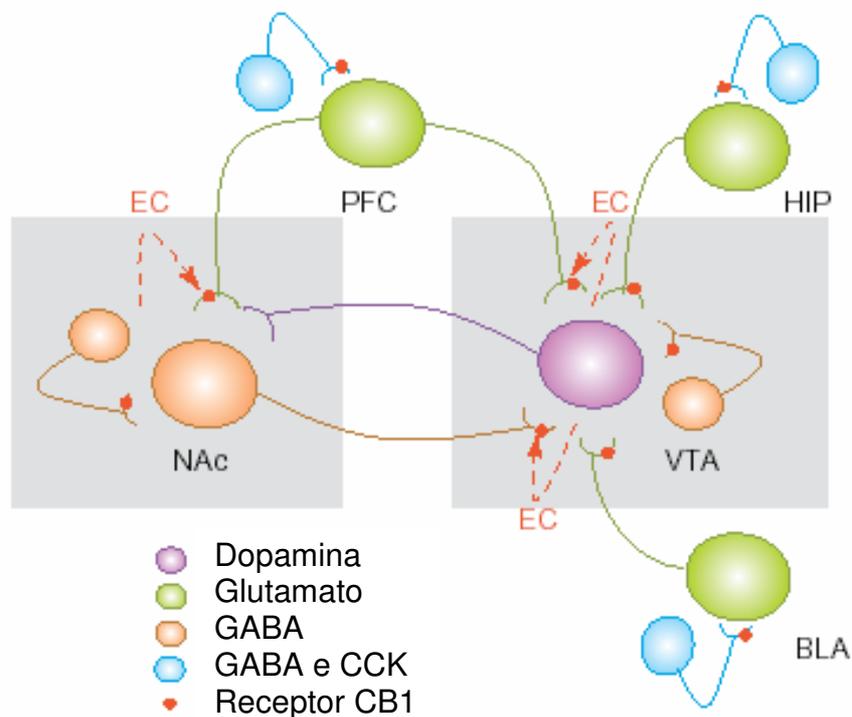
Considerando os dados clínicos que sinalizam que o consumo precoce de uma droga, como no período da adolescência, está altamente associado com o uso crônico e mais severo da droga na idade adulta (Estroff *et al.*, 1989; Anthony e Petronis, 1995; Clark *et al.*, 1998), esperar-se-ia que os estudos pré-clínicos mostrariam efeitos reforçadores aumentados induzidos pela cocaína para adolescentes em comparação aos adultos. Entretanto, respostas semelhantes para o condicionamento de lugar têm sido encontradas para animais adolescentes e adultos tratados cocaína (Schramm-Sapyta *et al.*, 2004), sugerindo que os adolescentes são tão vulneráveis quanto os adultos às propriedades reforçadoras da cocaína. Outras drogas, tais como a nicotina e o álcool, induziram preferências ao lugar mais acentuadas em adolescentes do que em adultos (Vastola *et al.*, 2002; Belluzzi *et al.*, 2004; Philpot *et al.*, 2003; Torrella *et al.*, 2004). Entretanto, o oposto foi encontrado para anfetaminas, ou seja, com preferência ao lugar relativamente maior em adultos do que em adolescentes (Adriani e Laviola, 2003). De maneira que mais estudos que investiguem os efeitos de drogas de abuso devem ser realizados nessa etapa da vida e, especialmente, aliando fatores que aumentem a probabilidade de consumo de drogas como, por exemplo, em modelos comportamentais do TDAH.

Como mencionado anteriormente, o potencial de abuso de muitas drogas, incluindo o  $\Delta^9$ -THC, está relacionado com a ativação de estruturas ligadas ao núcleo *accumbens* (Tanda *et al.*, 1997). A dificuldade em obter efeitos reforçadores positivos induzidos por canabinóides em animais de laboratório também foi parcialmente atribuída à ativação do núcleo *accumbens*. Evidências sugerem que a ativação do núcleo *accumbens* causa efeitos ansiogênicos (Joseph *et al.*, 1996; Salamone *et al.*, 1997). Assim a ativação desta área pode estar mais correlacionada com os efeitos tipo-ansiogênicos mediados pelos canabinóides (Onaivi *et al.*, 1990) do que com a recompensa. Ao contrário, o presente estudo mostra que os comportamentos relacionados à ansiedade e à recompensa/aversão parecem ser dissociados entre si, uma vez que a administração de WIN produziu efeitos estimulantes, reforçadores ou aversivos em doses que não alteraram o perfil tipo-ansiolítico/ansiogênico dos animais no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. Além disso, a ativação do sistema mesocorticolímbico pelas baixas doses de WIN pode explicar, pelo menos em parte, o aumento seletivo da resposta locomotora em um ambiente novo em ratos SHR adolescentes, uma vez que os receptores canabinóides atuam nos mecanismos de recompensa que regulam aspectos “motivacionais” do movimento (Maldonado *et al.*, 2006).

De fato, pesquisas que avaliam parâmetros neuroquímicos na adolescência têm focado desenvolvimento da via de recompensa (mesocorticolímbica). O “ajuste fino” da anatomia neuronal ocorre durante a adolescência, incluindo uma atividade neural aumentada (Chugani, 1998) e alterações na densidade de diversos receptores. Durante a adolescência, tanto receptores dopaminérgicos da via mesolímbica como os transportadores

de dopamina são extensamente produzidos (Teicher *et al.*, 1995; Tarazi *et al.*, 1998a,b, 1999). Diferenças relacionadas com a idade nos níveis de dopamina incluem um aumento na expressão de receptores de dopamina induzido pela cocaína, que não ocorreu em adolescentes, e diferenças na degradação enzimática de dopamina no estriado e no núcleo *accumbens*.

Essas evidências sugerem que o sistema dopaminérgico mesolímbico está submetido a uma marcada mudança durante a adolescência. Portanto, as diferentes respostas motivacionais (reforçadoras, aversivas e locomotoras) induzidas pelo WIN podem estar relacionadas com alterações na via dopaminérgica mesolímbica. Isto pode ser explicado pelo fato que os neurônios dopaminérgicos da via mesocorticolímbica são controlados por neurônios excitatórios e inibitórios que, por sua vez, são modulados por receptores canabinóides CB1. Assim, os endocanabinóides podem ser liberados por neurônios dopaminérgicos no núcleo *accumbens* (Robbe *et al.*, 2002) e na área tegmental ventral (Melis *et al.*, 2004; Riegel e Lupica, 2004). Conseqüentemente, os endocanabinóides atuando como mensageiros retrógrados modulam aferências glutamatérgicas e GABAérgicas da via dopaminérgica (Figura 12) . Além disso, a presença de receptores CB1 em outras estruturas relacionadas à motivação e à recompensa, tais como a amígdala basolateral e o hipocampo, pode também contribuir para a regulação do sistema endocanabinóide em funções que estão envolvidas na busca e no consumo de drogas (Katona *et al.*, 2001).



**Figura 12.** Representação esquemática dos possíveis locais de ação do sistema endocanabinoide na modulação do sistema de recompensa. Esquema adaptado de Maldonado et al. (2006). Córtex pré-frontal (PCF); hipocampo (HIP); núcleo accumbens (Nac); área tegmental ventral (VTA); amígdala baso-lateral (BLA), colecistocinina (CCK) e endocanabinóides (EC).

Alterações dopaminérgicas do circuito fronto-estriatal também estão envolvidos na neurobiologia do TDAH, visto que a eficácia de agonistas dopaminérgicos indiretos (por exemplo, o metilfenidato) está relacionada com a ocupação dos transportadores de dopamina no estriado e pelo conseqüente aumento dos níveis extracelulares de dopamina nessa área (Volkow *et al.*, 2005). Os efeitos da dopamina estão mediados por duas famílias diferentes de receptores, denominadas como D1 (D1A/D1 e D1B/D5) e D2 (D2L/S, D3 e D4; Missale *et al.*, 1998). Os receptores do subtipo D1, que estão extensamente expressos no estriado e no córtex pré-frontal, podem ser particularmente relevantes para o TDAH. Ratos SHR possuem elevados

níveis de receptores D1 no núcleo *accumbens* em comparação ao ratos Wistar-Kyoto (Papa *et al.*, 2002; Kirouac *et al.*, 1993). Essas evidências sugerem possíveis substratos neurais envolvidos nas alterações locomotoras e nos efeitos reforçadores induzidos pelo WIN em ratos SHR. Outro indício indireto que substancia essa hipótese é que ratos SHR são mais sensíveis à estimulação locomotora induzida por um agonista total receptores da dopamina D1 (SKF-81297, 10 mg/kg, i.p.), quando comparados a ratos Wistar-Kyoto (Diaz Heijtz e Castellanos, 2006).

Além da marcada presença de receptores CB1 em estruturas do sistema de recompensa, esses receptores estão densamente distribuídos no cerebelo e os gânglios da base. Essas áreas são conhecidas por mediar o início e a coordenação do movimento (Breivogel e Childers, 1998). A alta densidade de receptores CB1 especialmente nos terminais axoniais do estriado, nos neurônios GABAérgicos dos gânglios da base e das células granulares do cerebelo, estão provavelmente envolvidos no controle motor (Howlett, 1995). Assim, os receptores canabinóides podem modular tanto a inibição como a estimulação da transmissão neuronal nos gânglios da base e podem, desta forma, fornecer uma regulação dual do movimento (Sanudo-Peña *et al.*, 1996; van der Stelt e Di Marzo, 2003). Essas evidências estão no foco de diversos estudos que mostram que administração aguda de agonistas canabinóides em roedores estimula a locomoção em baixas doses e inibe a atividade motora em doses maiores (veja Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1998). No presente estudo, o tratamento com a maior dose de WIN testada (2,5 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente o número de entradas nos braços fechados, um índice de atividade locomotora (Pellow *et al.*, 1985), de ratos

adolescentes das linhagens Wistar e SHR no LCE. No entanto, os resultados mostrando que essa dose de WIN (2,5 mg/kg, i.p.) não reduziu a atividade locomotora de ratos adultos, estão em contraste com estudos prévios (Sanudo-Pena *et al.*, 2000; Lichtman *et al.*, 2001) que mostram efeitos catalépticos de altas doses de  $\Delta^9$ -THC.

Nosso estudo mostra ainda uma sensibilidade ontogênica para os efeitos do WIN, estendendo os estudos prévios disponíveis na literatura que indicam uma resposta aumentada para agonistas canabinóides durante a adolescência em roedores. Por exemplo, Cha *e cols.* (2006) recentemente demonstraram que a administração sistêmica de  $\Delta^9$ -THC induz déficits mais pronunciados em ratos adolescentes do que em adultos, no aprendizado espacial e não espacial no teste do labirinto aquático de Morris. O'Shea *e cols.* (2004) observaram um aumento do comportamento relacionado à ansiedade e um déficit na memória de procedimentos em ratos adolescentes, mas não em ratos adultos, tratados com o agonista canabinóide CP 55,940 por dez dias. Além disso, o tratamento repetido (25 dias) com WIN durante a adolescência causou um prejuízo na memória, na função sensório-motora e no desempenho da tarefa operante de razão progressiva que persistiu durante a idade adulta, enquanto o tratamento durante a idade adulta não causou os mesmos efeitos persistentes (Schneider e Koch, 2003).

Em concordância com o presente conjunto de resultados comportamentais, Rodriguez de Fonseca *et al.* (1993) mostraram que o pico de expressão dos receptores canabinóides no cérebro de ratos ocorre durante a adolescência (entre o período pós-natal do dia 30 e 40) e, a partir daí, o número de receptores canabinóides começa a diminuir até alcançar os níveis

encontrados na idade adulta. Por outro lado, apesar dos resultados mostrarem estimulação locomotora e propriedades reforçadoras induzidas pelo WIN em ratos SHR, a expressão de receptores CB1 no cérebro de ratos adolescentes desta linhagem permanece indeterminada.

A exposição aos canabinóides em roedores está associada com um efeito bifásico nos comportamentos relacionados à ansiedade (Onaivi *et al.*, 1990; Rodrigues de Fonseca *et al.*, 1998; Berrendero e Maldonado, 2002; Haller *et al.*, 2004; O'Shea *et al.*, 2004; Viveros *et al.*, 2005), ao menos nas faixas de doses avaliadas no presente estudo o WIN não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade tanto no CA (locomoção central) como no LCE (tempo nos braços abertos) de ratos adolescentes e adultos das linhagens Wistar e SHR. Neste estudo, os animais da linhagem SHR (independentemente da idade) apresentaram uma exploração aumentada nos braços abertos no LCE e cruzaram significativamente mais quadrados na área central aversiva do CA do que ratos Wistar, respostas que são consistentes com uma redução da “ansiedade” (Hall, 1936; Pellow *et al.*, 1985). Este achado está de acordo com o relatado para ratos SHR adultos (Ramos *et al.*, 1997; 2002).

Em conclusão, o presente estudo sugere que a administração sistêmica do agonista de receptor canabinóide WIN induz diferentes efeitos locomotores e reforçadores dependendo da idade e linhagem de ratos investigados. Durante a adolescência, aumenta seletivamente a locomoção (0,25 ou 1,25 mg/kg, i.p.) e possui propriedades reforçadoras (2,5 mg/kg, i.p.) em animais SHR, além de causar diminuição da atividade locomotora (2,5 mg/kg, i.p.) em ratos de ambas as linhagens. Na idade adulta, produz aversão em ratos

Wistar (0,25; 1,25 e 2,5 mg/kg, i.p.) e reforço positivo em ratos SHR (0,25 mg/kg, i.p.). Além disso, os efeitos locomotores e reforçadores induzidos pela ativação do sistema canabinoide não parecem estar correlacionados com alterações em comportamentos de ansiedade dos animais. Essas evidências sugerem que a adolescência e o perfil relacionado ao TDAH modelados em ratos SHR podem constituir fatores que aumentam a sensibilidade aos canabinóides. Serão necessárias pesquisas adicionais para explorar os mecanismos pelos quais os canabinóides exercem essas ações, a fim de estabelecer como a relação entre a idade e os fatores genéticos podem contribuir para o consumo e abuso de derivados canabinóides.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adriani, W., Caprioli, A., Granstrem, O., Carli, M., Laviola, G., 2003. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of ADHD: evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 639-651.

Adriani, W., Laviola, G., 2003. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with D-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behav. Neurosci.* 117, 695–703.

Adriani, W., Laviola, G., 2004. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav. Pharmacol.* 15, 341–352.

Amini, B., Yang, P.B., Swann, A.C., Dafny, N., 2004. Differential locomotor responses in male rats from three strains to acute methylphenidate. *Int. J. Neurosci.* 114, 1063-1084.

Andersen, S.L., Arvanitogiannis, A., Pliakas, A.M., LeBlanc, C., Carlezon, W.A., 2002. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nature Neurosci.* 5, 13–14.

Annis, H.M. e Smart, R.G., 1973. Adverse reactions and recurrences from marijuana use. *Br J Addict Alcohol Other Drugs*, 68, 315-319.

Anthony, J.C., Petronis, K.R., 1995. Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug Alcohol Depend.* 40, 9-15.

Arnett, J., 1992. Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. *Dev. Rev.*, 12, 339-373.

Bardo, M.T., 1998. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 37-67.

Barrickman, L., Noyes, R., Kuperman, S., Schumacher, E., Verda, M., 1991. Treatment of ADHD with fluoxetine: a preliminary trial. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 30, 762-767.

Barron, S., White, A., Swartzwelder, H.S., Bell, R.L., Rodd, Z.A., Slawecki, C.J., Ehlers, C.L., Levin, E.D., Rezvani, A.H., Spear, L.P., 2005. Adolescent vulnerabilities to chronic alcohol or nicotine exposure: findings from rodent models. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29, 1720-1725.

Belluzzi, J.D., Lee, A.G., Oliff, H.S., Leslie, F.M., 2004. Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology.* 174, 389-395.

- Berrendero, F., Maldonado, R., 2002. Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by delta (9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* 163, 111–117.
- Bidaut-Russell, M., Devane, W.A., Howlett, A.C., 1990. Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J. Neurochem.* 55, 21-26.
- Biederman, J., Spencer, T., 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol. Psychiatry.* 46, 1234-1242.
- Bisogno, T., Ligresti, A., Di Marzo, V., 2005. The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 224-238.
- Boix, F., Qiao, S., Kolpus, T., Sagvolden, T., 1998. Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Behav. Brain Res.* 94, 153-162.
- Braida, D., Iosue, S., Pegorini, S., Sala, M., 2004. Delta9-tetrahydrocannabinol-induced conditioned place preference and intracerebroventricular self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 506, 63-69.
- Breivogel, C.S., Childers, S.R., 1998. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol. Dis.* 5, 417-431.
- Cardinal, R.N., Winstanley, C.A., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2004. Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1021, 33-50.
- Carlini, E. A., 2004. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) on humans. *Toxicol.* 44, 461-467.
- Carpentier, P.J., de Jong, C.A., Dijkstra, B.A., Verbrugge, C.A., Krabbe, P.F.. 2005. A controlled trial of methylphenidate in adults with attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders. *Addiction.*100, 1868-1874.
- Casey, B.J., Giedd, J.N., Thomas, K.M., 2000. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol. Psychol.* 54, 241–157.
- Caster, J.M., Walker, Q.D., Kuhn, C.M., 2005. Enhanced behavioral response to repeated-dose cocaine in adolescent rats. *Psychopharmacology.* 183, 218-225.

- Cha, Y.M., White, A.M., Kuhn, C.M., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., 2006. Differential effects of delta-9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 448-455.
- Chambers, R.A., Taylor, J.R., Potenza, M.N., 2003. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: A critical period of addiction vulnerability. *Am. J. Psychiatry.* 160,1041–1052.
- Chaperon, F., Soubrie, P., Puech, A.J., Thiebot, M.H., 1998. Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology.* 135, 324-332.
- Childers, S.R., Breivogel, C.S., 1998. Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alcohol Depend.* 51, 173-187.
- Chiu, P., Rajakumar, G., Chiu, S., Kwan, C.Y., Mishra, R.K., 1982. Enhanced [<sup>3</sup>H]spiroperidol binding in striatum of spontaneously hypertensive rat (SHR). *Eur. J. Pharmacol.* 27, 243-244.
- Chugani, H.T., 1998. A critical period of brain development: studies of cerebral glucose utilization with PET. *Prev. Med.* 27, 184-188.
- Clark, D.B., Kirisci, L., Moss, H.B., 1998. Early adolescent gateway drug use in sons of fathers with substance use disorders. *Addict. Behav.* 23, 561-566.
- Corcoran, M.E., Amit, Z., 1974. Reluctance of rats to drink hashish suspensions: free-choice and forced consumption, and the effects of hypothalamic stimulation. *Psychopharmacologia.* 35,129-147.
- Crowley, T.J., Macdonald, M.J., Whitmore, E.A., Mikulich, S.K., 1998. Cannabis dependence, withdrawal, and reinforcing effects among adolescents with conduct symptoms and substance use disorders. *Drug Alcohol Depend.* 50, 27-37.
- Cruz, A.P., Frei, F., Graeff, F.G., 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171-176.
- Da Silva, G.E., Vendruscolo, L.F., Takahashi, R.N., 2005. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 77, 693-706.
- Davids, E., Zhang, K., Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 2003. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res. Rev.* 42:1–21.
- Davies, L.P., Hambley, J.W., Johnston, J.A.R., 1987. Reduced adenosine deaminase activity in the CNS of spontaneously hypertensive rats. *Neurochem. Int.* 10, 533–536.

De Bellis, M.D., Keshavan, M.S., Beers, S.R., Hall, J., Frustaci, K., Masalehdan, A., 2001. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb. Cortex* 11, 552–557.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. e Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor *Science* 258, 1946-1949.

Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(9):771-784

Diaz Heijtz, R., Castellanos, F.X., 2006. Differential effects of a selective dopamine D1-like receptor agonist on motor activity and c-fos expression in the frontal-striatal circuitry of SHR and Wistar-Kyoto rats. *Behav. Brain Funct.* 2,18-24.

Drews, E., Schneider, M., Koch, M., 2005. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 145-150.

Estroff, T.W., Schwartz, R.H., Hoffmann, N.G., 1989. Adolescent cocaine abuse. Addictive potential, behavioral and psychiatric effects. *Clin. Pediatr.* 28, 550-555.

Ferrari, F., Ottani, A., Giuliani, D., 1999. Influence of the cannabinoid agonist HU 210 on cocaine- and CQP 201-403-induced behavioural effects in rat. *Life Sci.* 65, 823-831.

Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation, structure , and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chemistry Soc.* 86, 1646-1647.

Gardner, E.L., 1997. Brain reward mechanisms. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, editors. *Substance abuse: a comprehensive textbook*, 3rd edn. Baltimore' Williams & Wilkins 51– 85.

Gardner, E.L., 2002. Addictive potential of cannabinoids: the underlying neurobiology. *Chem. Phys. Lipids.* 121, 267-290.

Gardner, E.L., 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 263-284.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature.* 379, 606-612.

Gerra, G., Caccavari, R., Fontanesi, B., Delsignore, R., Fertoni-Affini, G., Marcato, A., Maestri, D., Avanzini, P., Perna, G., Brambilla, F., 1994. Alpha-2-adrenoceptor sensitivity in heroin addicts with and without previous attention

deficit disorder/hyperactivity and conduct disorder. *Neuropsychobiol.* 30, 15-29.

Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D., 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat. Neurosci.* 2, 358-363.

Gordon, S.M., Tulak, F., Troncale, J., 2004. Prevalence and characteristics of adolescents patients with co-occurring ADHD and substance dependence. *J. Addict. Dis.* 23, 31-40.

Greydanus, D.E., Patel, D.R., 2005. The Adolescent and Substance Abuse: Current Concepts. *Curr. Probl. Pediatric and Adolesc. Health Care* 35,78-98.

Guerriero, R.M., Hayes, M.M., Dhaliwal, S.K., Ren, J.Q., Kosofsky, B.E., 2006. Preadolescent methylphenidate versus cocaine treatment differ in the expression of cocaine-induced locomotor sensitization during adolescence and adulthood. *Biol. Psychiatry.* 60, 1171-1180.

Hall, C.S., 1936. Emotional behavior in the rat. III The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.* 22, 345-452.

Haller, J., Varga, B., Ledent, C., Freund, T.F., 2004. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav. Pharmacol.* 15, 299-304.

Harris, R.T., Waters, W., McLendon, D., 1974. Evaluation of reinforcing capability of delta 9-THC in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia* 37, 23-39.

Hayase, T., Yamamoto, Y., Yamamoto, K., 2001. Protective effects of cannabinoid receptor agonists against cocaine and other convulsant-induced toxic behavioural symptoms. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1525-1532.

Henry, D.J., Chavkin, C., 1995. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Lett.* 186, 91-94.

Himelstein, J., Newcorn, J.H., Halperin, J.M., 2000. The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Front. Biosci.* 5, 61-78.

Hoffman, A.F., Lupica, C.R., 2000. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci.* 20, 2470-2479.

Holene, E., Nafstad, I., Skaare, J.U., Sagvolden, T., 1998. Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Behav. Brain Res.* 94, 213-224.

- Hollister, L. E., 1986. Health aspects of cannabis. *Pharmacol. Rev.* 38,1-20.
- Howlett, A.C., 1995. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 607-634.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54:,61-202.
- Howlett, A.C., Fleming, R.M., 1984. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26, 532-538.
- ILAR News, 1992. Definition, nomenclature, and conservation of rat strains. 34 (4), [http://dels.nas.edu/ilar/jour\\_online/34\\_4/definitionandnomenrat.asp](http://dels.nas.edu/ilar/jour_online/34_4/definitionandnomenrat.asp).
- Jessor, R., 1991. Risk behavior in adolescence: a psychosocial framework for understanding and action. *J. Adolesc. Health* 12, 597-605.
- Joseph, M.H., Young, A.M.J., Gray, J.A., 1996. Are neurochemistry and reinforcement enough? Can the abuse potential of drugs be explained by common actions on a dopamine reward system in the brain? *Hum. Psychopharmacol.* 11, 55–63.
- Jucaite, A., Fernell, E., Halldin, C., Forssberg, H., Farde, L., 2005. Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. *Biol. Psychiatry.* 57, 229-38.
- Justinova, Z., Tanda, G., Redhi, G.H., Goldberg, S.R., 2003. Self-administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 69,135-140.
- Kandel, D, Logan J., 1984. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I: periods of initiation, continued use, and discontinuation. *Am J Publ. Health* 74, 660-666.
- Karniol, I.G., Carlini, E.A., 1973. Comparative studies in man and in laboratory animals on 8 - and 9 -trans-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology* 9, 115-126.
- Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T.F., 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 21, 9506-9518.
- Kirouac, G.J., Ganguly, P.K., 1993. Cholecystokinin receptor density in the striatum of the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 604, 338-341.

- Klebaur, J.E., Bevins, R.A., Segar, T.M., Bardo, M.T., 2001. Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav. Pharmacol.* 12, 267–275.
- Krause, K.H., Dresel, S.H., Krause, J., la Fougere, C., Ackenheil, M., 2003. The dopamine transporter and neuroimaging in attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 605-613.
- Leite, J.R., Carlini, E.A., 1974. Failure to obtain "cannabis-directed behavior" and abstinence syndrome in rats chronically treated with cannabis sativa extracts. *Psychopharmacologia.* 36, 133-145.
- Lepore, M., Vorel, S.R., Lowinson, J., Gardner, E.L., 1995. Conditioned place preference induced by delta-9-tetrahydrocannabinol: comparison with cocaine, morphine, and food reward. *Life Sci.* 56, 2073-2080.
- Lichtman, A.H., Sheikh, S.M., Loh, H.H., Martin, B.R., 2001. Opioid and cannabinoid modulation of precipitated withdrawal in delta(9)-tetrahydrocannabinol and morphine-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1007-1014.
- Makriyannis, A., Mechoulam, R., Piomelli, D., 2005. Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system. *Neuropharmacology.* 48, 1068-1071.
- Maldonado, R., Valverde, O., Berrendero, F., 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29, 225-232.
- Mansbach, R.S., Nicholson, K.L., Martin, B.R., Balster, R.L., 1994. Failure of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and CP 55,940 to maintain intravenous self-administration under a fixed-interval schedule in Rhesus monkeys. *Behav. Pharmacol.* 5, 219-225.
- Martellotta, M.C., Cossu, G., Fattore, L., Gessa, G.L., Fratta, W., 1998. Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neurosci.* 85, 327-330.
- Masserano, J.M., Karoum, F., Wyatt, R.J., 1999. SR 141716A, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, potentiates the locomotor stimulant effects of amphetamine and apomorphine. *Behav. Pharmacol.* 10, 429-432.
- McAllister, S.D., Glass, M., 2002. CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor-mediated signaling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 161-171.
- McBride, W.J., Murphy, J.M., Ikemoto, S., 1999. Localization of brain reinforcement mechanism: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav. Brain Res.* 101, 129-152.

- Mcgregor, I.S., Issakidis, C.N., Prior, G., 1996. Aversive Effects of the synthetic Cannabinoid CP 55,940 in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 657-664.
- McKeon, T.W., Hendley, E.D., 1988. Brain monoamines and metabolites in hypertensive and hyperactive rat strains. *Clin. Exp. Hypertens.* 10, 971-994.
- Melis, M., Pistis, M., Perra, S., Muntoni, A.L., Pillolla, G., Gessa, G.L., 2004. Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. *J. Neurosci.* 24, 53-62.
- Meschler, J.P., Howlett, A.C., 2001. Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacol.* 40, 918-926.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189-225.
- Moser, M.B., Moser, E.I., Wultz, B., Sagvolden, T., 1988. Component analysis differentiate between exploratory behaviour of spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats in a two-compartment free-exploration open field. *Scand. J. Psychol.* 29, 200–206.
- Muglia, P., Jain, U., Macciardi, F., Kennedy, J.L., 2000. Adult attention deficit hyperactivity disorder and the dopamine D4 receptor gene. *Am. J. Méd. Genet.* 96, 273-277.
- Nadal, R., Armario, A., Janak, P.H., 2002. Positive relationship between activity in a novel environment and operant ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology* 62, 333 –338.
- Napier, T.C., Mitrovic, I., 1999. Opioid modulation of ventral pallidal inputs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 176-201
- Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27, 282-293
- Onaivi, E.S., Green, M.R., Martin, B.R., 1990. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 1002–1009.
- O'Shea, M., Singh, M.E., McGregor, I.S., Mallet, P.E., 2004. Chronic cannabinoid exposure produces lasting memory impairment and increased anxiety in adolescent but not adult rats. *J. Psychopharmacology.* 18, 502-508.
- Pamplona, F.A., Takahashi, R.N., 2006. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci. Lett.* 397, 88-92.

- Papa, M., Diewald, L., Carey, M.P., Esposito, F.J., Gironi Carnevale, U.A., Sadile, A.G., 2002. A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. *Behav. Brain Res.* 130, 171-199.
- Paus, T., Zijdenbos, A., Worsley, K., 1999. Collins DL, Blumenthal J, Giedd JN. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283, 1908–1911.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- Pertwee, R.G., 2005. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* 76, 1307-1324.
- Philpot, R.M., Badanich, K.A., Kirstein, C.L., 2003. Place conditioning: age-related changes in the rewarding and aversive effects of alcohol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 27, 593-599.
- Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 4, 873-884.
- Puumala, T., Routsalainen, S., Jakala, P., Koivisto, E., Riekkinen, P., Sirviö, J., 1996. Behavioral and pharmacological studies on the validation of a new animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66, 198-211.
- Ramos, A., Berton, O., Mormede, P., Chaouloff, F., 1997. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.* 85, 57-69.
- Ramos, A., Kangerki, A.L., Basso, P.F., Da Silva, G.E., Santos, J.E., Assreuy, J., Vendruscolo, L.F., Takahashi, R.N., 2002. Evaluation of Lewis and SHR rat strains as a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behav. Brain Res.* 129, 113-123.
- Riegel, A.C., Lupica, C.R., 2004. Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 24, 11070-11078.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., Manzoni, O.J., 2002. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 8384-8388
- Robbins, T.W., 2002. ADHD and Addiction. *Nat. Med.* 8, 24-25.

Rodriguez de Fonseca, F., Rubio, P., Menzaghi, F., Merlo-Pich, E., Rivier, J., Koob, G.F., Navarro, M., 1996. Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe<sup>12</sup>,Nle<sup>21,38</sup>,C alpha MeLeu<sup>37</sup>] CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive-withdrawal behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 276, 56-64.

Rodriguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martin-Calderon, J.L., Gorriti, M.A., Navarro, M., 1998. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol. Dis.* 5, 483–501.

Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnin, A., Fernandez-Ruiz, J.J., 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport* 4, 135-138.

Robbins, T.W., 2002. ADHD and addiction. *Nat. Med.* 8, 24-25

Russell, V., de Villiers, A., Sagvolden, T., Lamm, M., Taljaard, J., 1995. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 676, 343–351.

Sadile, A.G., Pelicano, M.P., Sagvolden, T., Sergeant, J.A., 1996. NMDA and non-NMDA sensitive [<sup>3</sup>H] glutamate receptor binding in the brain of the Naples high- and low-excitability rats: an autoradiographic study. *Behav. Brain Res.* 78, 163-174.

Sagvolden, T., 2000. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neuroscience and Biobehav. Rev.* 24, 31–39.

Sagvolden, T., Metzger, M.A., Schiørbeck, H.K., Rugland, A.L., Spinnangr, I., Sagvolden, G., 1992. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants. *Behav. Neural Biol.* 58, 103–112.

Sagvolden, T., Sergeant, J.A., 1998. Attention deficit/hyperactivity disorder--from brain dysfunctions to behaviour. *Behav. Brain Res.* 94, 1-10.

Salamone, J.D., Cousins, M.S., Snyder, B.J., 1997. Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 341–359.

Sanchis-Segura, C., Spanage, I R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology*, 11, 2–38.

Sañudo-Peña, M.C., Patrick, S.L., Patrick, R.L., Walker, J.M., 1996. Effects of intranigral cannabinoids on rotational behavior in rats: interactions with the dopaminergic system. *Neurosci. Lett.* 206, 21-24.

Sanudo-Pena, M.C., Tsou, K., Delay, E.R., Hohman, A.G., Force, M., Walker, J.M., 1997. Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. *Neurosci Lett.* 223, 125-128.

Sañudo-Peña, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernandez-Ruiz, J.J., Walker, J.M., 2000. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur. J. Pharmacol.* 391, 269–274.

Schneider, M., Koch, M., 2003. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacol.* 28, 1760-1769.

Schramm-Sapyta, N.L., Pratt, A.R., Winder, D.G., 2004. Effects of periadolescent versus adult cocaine exposure on cocaine conditioned place preference and motor sensitization in mice. *Psychopharmacology* 173, 41-48.

Schubiner, H., Tzelepis, A., Milberger, S., Lockhart, N., Kruger, M., Kelley, B.J., Schoener, E.P., 2000. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder among substance abusers. *J. Clin. Psychiatry.* 61, 244-251

Schubiner, H., 2005. Substance abuse in patients with attention-deficit hyperactivity disorder: therapeutic implications. *CNS Drugs* 19, 643-655.

Seeman, P., Madras, B.K., 1998. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol. Psychiatry* 3, 386-396.

Shaywitz, B.A., Klopfer, J.H., Yager, R.D., 1976. Gordon, J.W. Paradoxical response to amphetamine in developing rats treated with 6-hydroxydopamine. *Nature.* 261, 153-155.

Silbergeld, E.K., Goldberg, A.M., 1974. Lead-induced behavioral dysfunction: an animal model of hyperactivity. *Exp. Neurol.* 42, 146-157.

Sowell, E.R., Peterson, B.S., Thompson, P.M., Welcome, S.E., Henkenius, A.L., Toga, A.W., 2003. Mapping cortical change across the human life span. *Nat. Neurosci.* 6, 309–315.

Sowell, E.R., Thompson, P.M., Tessner, K.D., Toga, A.W., 2001. Mapping continued brain growth and gray matter density reduction in dorsal frontal cortex: Inverse relationships during postadolescent brain maturation. *J. Neurosci.* 21, 8819–8829.

Spear, L.P., Brake, S.C., 1983. Periadolescent: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev. Psychobiol.* 16, 83 –109.

- Stoff, D.M., Friedman, E., Pollock, L., Vitiello, B., Kendall, P.C., Bridger, W.H., 1989. Elevated platelet MAO is related to impulsivity in disruptive behavior disorders. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 28, 754-760.
- Sullivan, M.A., Rudnik-Levin, F., 2001. Attention deficit/hyperactivity and substance abuse. Diagnostic and therapeutic considerations. *Ann. NY Acad. Sci.* 931, 251-270.
- Swanson, J.M., Sergeant, J.A, Taylor, E., Sonuga-Barke, E.J.S., Jensen, P.S., Cantwell, D.P., 1998. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351, 429-433.
- Szabo, B., Muller, T., Koch, H., 1999. Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro. *J. Neurochem.* 73, 1084-1089.
- Takahashi, R.N., Singer, G., 1979. Self-administration of delta 9-tetrahydrocannabinol by rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11, 737-740.
- Tanda, G., Munzar, P., Goldberg, S.R., 2000. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat. Neurosci.* 3, 1073-1074.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., Di Chiara, G., 1997. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common m1 opioid receptor mechanism. *Science* 276, 2048–2050.
- Tarazi, F.I., Tomasini, E.C., Baldessarini, R.J., 1998a. Postnatal development of dopamine and serotonin transporter in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci. Lett.* 254, 21-24
- Tarazi, F.I., Tomasini, E.C., Baldessarini, R.J., 1998b. Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D-2 like receptor. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110, 227-233.
- Tarazi, F.I., Tomasini, E.C., Baldessarini, R.J., 1999. Postnatal development of dopamine D1-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D-2 like receptor. *Brain. Res Dev. Brain Res.* 110, 227-233.
- Taylor, E., 1998. Clinical foundations of hyperactivity research. *Behavioural Brain Res.* 94, 11-24.
- Teicher, M.H., Andersen, S.L., Hostetter, Jr. J.C., 1995. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Bain Res. Dev. Brain Res.* 89, 167-172
- Tennant, F.S., Jr., Groesbeck, C.J., 1972. Psychiatric effects of hashish. *Arch Gen. Psychiatry* 27, 133-136.

- Torrella, T.A., Badanich, K.A., Philpot, R.M., Kirstein, C.L., Wecker, L., 2004. Developmental differences in nicotine place conditioning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1021, 399-403.
- Tsai, C.F., Lin, M.T., 1988. Locomotor hyperactivity in hypertensive rats. *Pharmacology* 36, 27-34.
- Twitchell, W., Brown, S., Mackie, K., 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43-50.
- Usuda, I., Tanaka, K., Chiba, T., 1998. Efferent projections of the nucleus accumbens in the rat with special reference to subdivision of the nucleus: biotinylated dextran amine study. *Brain Res.* 797, 73-93.
- Vaiva, G., De Lenclave, M.B., Bailly, D., 2002. Treatment of comorbid opiate addiction and attention-deficit hyperactivity disorder (residual type) with moclobemide: a case report. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 26, 609-611.
- Valjent, E., Maldonado, R., 2000. A behavioural model to reveal place preference to delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. *Psychopharmacology* 147, 436-438.
- van der Stelt, M., Di Marzo, V., 2003. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 480, 133-150.
- Van Ree, J.M., Slangen, J., Wled, D., 1978. Intravenous self administration of drugs in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 20, 547-557
- Vastola, B.J., Douglas, L.A., Varlinskaya, E.I., Spear, L.P., 2002. Nicotine-induced conditioned place preference in adolescent and adult rats. *Physiol. Behav.* 77, 107-114.
- Viveros, M.P., Marco, E.M., File, S.E., 2005. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 331-342.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Ding, Y.S., 2005. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry.* 57, 1410-1415.
- Wilens, T.E.. 2004. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the substance use disorders: the nature of the relationship, subtypes at risk, and treatment issues. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 27, 283-301.
- Wills, T.A., Sandy, J.M., Shinar, O., 1999. Cloninger's constructs related to substance use level and problems in late adolescence: A mediational model based on self-control and coping motives. *Exp. Clin. Psychopharmacology.* 7,

122-134.

Wilson, J.J., Levin, F.R., 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder and early-onset substance use disorders. *J. Child. Adolesc. Psychopharmacol.* 15, 751-763.

Wultz, B., Sagvolden, T., Moser, E.I., Moser, M., 1990. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hiperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. *Behav. and Neural Biol.* 53, 88-102.

Yamaguchi, K., Kandel, D.B., 1984. Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: III. Predictors of progression. *Am. J. Public. Health.* 74, 673-681.

Zahm, D.S., 2000. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 85-105.

## **ANEXOS**

Parte desses resultados estão publicados em:

- PANDOLFO, P.; Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S.; Takahashi, R.N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats (SHR), an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), to the locomotor stimulation-induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *European Journal of Pharmacology*, 563: 141-148, 2007.

Outros trabalhos desenvolvidos durante o período:

- Assini, F.L.; Zanette, K.D.; Brocardo, P.S.; PANDOLFO, P.; Rodrigues, A.L.S.; Takahashi, R.N. Behavioral effects and ChE measures after acute and repeated administration of malathion in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 443–449, 2005.
- Brocardo, P.S.; PANDOLFO, P.; Takahashi, R.N.; Rodrigues, A.L.S.; Dafre, A.L. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology*. 207:283–29, 2005.
- Prediger, R.D.S.; Pamplona, F.A.; PANDOLFO, P.; Duarte, F.S.; Ferreira, J.B.; Calixto, R.N.; Takahashi, R.N. Emotional component alters pain response in  $\beta$ -amyloid model of Alzheimer's disease in mice. *European Neuropsychopharmacology*, 15 (Suppl 3): S375, 2005.
- Prediger, R.D.S.; Batista, L.C.; Medeiros, R.; PANDOLFO, P.; Florio, J.C.; Takahashi, R.N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 202: 391–403, 2006.
- Pamplona, F.A.; Prediger, R.D.S.; PANDOLFO, P.; Takahashi, R.N. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 188: 641–649, 2006.
- Brocardo, P.S.; Assini, F.L.; Franco, J.L.; PANDOLFO, P.; Muller, Y.M.R.; Takahashi, R.N.; Dafre, A.L.; Rodrigues, A.L.S. Zinc reverses malathion-induced depressant-like behavior, morphological and oxidative damage in the rat brain. *Toxicological Science*, in press, 2007.
- Prediger, R.D.S.; Franco, J.L.; PANDOLFO, P.; Medeiros, R.; Duarte, F.S.; Di Giunta, G.; Figueiredo, C.P.; Farina, M.; Calixto, J.B.; Takahashi, R.N.; Dafre, A.L. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino

mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behavioural Brain Research*, 177: 205-13, 2007.

- Franco, J.L.; Prediger, R.D.S.; PANDOLFO, P.; Takahashi, R.N.; Farina, M.; Dafre, A.L. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Science*, 80: 1906-1914, 2007.
- Medeiros, R.; Prediger, R.D.S.; Passos, G.F.; PANDOLFO, P.; Duarte, FS.; Franco, J.L.; Dafre, A.L.; Di Giunta, G.; Figueiredo, C.P.; Takahashi, R.N.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Connecting TNF- $\alpha$  signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid- $\beta$  protein. *The Journal of Neuroscience*, in press, 2007.