



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

José Inácio Lemos Monteiro Carvalho

**Participação dos receptores canabinóides cerebrais
na tolerância rápida e aguda do álcool.**

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.
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gina Struffaldi Morato

Florianópolis-SC

2006

CARVALHO, J.I.L.M. Participação dos receptores canabinóides cerebrais na tolerância rápida e aguda do álcool. Florianópolis, 2005. 97p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Gina Struffaldi Morato

Defesa: 17/02/2006.

Evidências sugerem que o sistema de [neurotransmissão endocanabinóide] modula o consumo de [álcool]. Trabalhos prévios do laboratório mostraram o desenvolvimento de [tolerância rápida] cruzada entre [etanol] e Δ^9 -tetrahydrocannabinol, porém pouco se sabe sobre o envolvimento desse sistema de neurotransmissão na [tolerância ao etanol]. Diante disso, o presente estudo apresentou como objetivo inicial estudar o envolvimento dos [receptores canabinóides (CB1) cerebrais] nas [tolerâncias rápida e aguda ao etanol]. Observou-se que a administração sistêmica (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v.) do antagonista CB1 SR141716 (SR) bloquearam o desenvolvimento da [tolerância rápida] à incoordenação motora induzida por [etanol], sendo esse efeito revertido pelo agonista CB1 WIN55,212-2. Nos experimentos de [tolerância aguda], a administração i.c.v. de SR reduziu as concentrações plasmáticas de [álcool], efeito revertido por WIN55,212-2, sem no entanto interferir no prejuízo motor. Para tentar compreender se a redução das concentrações plasmáticas de [álcool] era devida a uma maior eliminação da droga, foram realizadas avaliações cardiovasculares e dosagem de [etanol] na urina. A administração i.c.v. de SR não alterou o volume urinário, porém reduziu a concentração de [etanol] na urina do grupo tratado com a maior dose (4 μ g). A administração i.p. de etanol reduziu a pressão arterial (PA) de ratos anestesiados, não alterando a frequência cardíaca (FC). A administração i.c.v. de SR (2 μ g) não alterou os valores cardiovasculares basais (PA e FC), porém aumentou significativamente a FC dos animais tratados com etanol. Tomados em conjunto, os dados do presente estudo sugerem um envolvimento importante dos [receptores CB1 cerebrais] na [tolerância] e sensibilidade ao [etanol], bem como nas alterações cardiovasculares e nas concentrações plasmáticas de [etanol].

*"Serei eu, porque nada é impossível,
Vários trazidos de outros mundos e,
No mesmo ponto espacial sensível
Que sou eu, sendo eu por estar aqui?"*

Fernando Pessoa

À minha mãe Isabel, à minha avó Izabel e à minha tia Isolina por me ensinarem que, para atingir meus objetivos, duas questões são fundamentais: dedicação própria e ajuda dos outros.

Às professoras Gina e Setsuko por despertarem e alimentarem minha paixão por farmacologia e neurociências.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um gesto de humildade: por reconhecer que tudo que foi conquistado só foi possível por causa da ajuda de muitos e, um exercício de memória: na tentativa de lembrar das muitas pessoas que foram importantes para que objetivos fossem convertidos em bons resultados.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a uma “Força Superior” que, quando pequeno, fui ensinado a chamar de Deus. Apesar de não acreditar algumas vezes, sempre que pedi ajuda e força, eu a recebi, muitas vezes sem saber de onde.

À minha querida mãe Isabel que sempre me ensinou, através de seus atos, a importância de buscar as coisas nas quais acredito e me dedicar para conquistá-las. Por me ensinar que o importante é “o ser” e não “o ter” e, que guardar rancor das pessoas é sempre mais prejudicial a mim mesmo. Enfim, por tudo de bom que existe em mim agradeço, pelo amor, pelo incentivo e por oferecer, mesmo com muito sacrifício, uma excelente educação.

À minha avó Izabel, pelo excelente exemplo de simplicidade e bondade, pelas palavras sábias e pelos ensinamentos.

À minha tia Isolina, que sempre foi uma mãe, por todo carinho e incentivo e por possibilitar que eu continuasse os estudos e viesse para Florianópolis.

Aos meus irmãos: Camila, Carina, Tarcisio, Jivago e, principalmente, Chiara, pelo enorme incentivo e pelas demonstrações de carinho, mesmo “estranhas” às vezes.

Aos meus tios Zeca, Iraci, Ivanilde e Irene que, mesmo longe, sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha orientadora, professora Gina, por me aceitar sem me conhecer, por me incentivar mesmo quando nada ia bem e não havia resultados e, principalmente, por valorizar meu trabalho e minha pessoa, ajudando-me em tudo sempre.

À professora Setsuko, por me dar acesso ao meio científico ao abrir as portas do Laboratório de Neurofisiologia, quando todas as outras me tinham sido fechadas, pelo enorme incentivo e pela valorização do meu trabalho e da minha pessoa.

À professora Vânia e a seu aluno Enéas pelo incentivo, pelas dicas e pela enorme ajuda durante a preparação para a seleção do mestrado.

Aos amigos de laboratório: Rafael Varaschin, Maristela, Leonardo, Marcos, Fabiana, Rafael Mariano e Saulo, por me ajudarem em tudo e por permitirem que esse trabalho fosse realizado, por toda ajuda nos experimentos, pelos momentos de descontração, pela amizade, pelo incentivo. Obrigado, o trabalho é nosso, reconheço isso.

Aos professores do departamento de farmacologia: Giles, por quebrar paradigmas e dogmas aprendidos na graduação; Calixto e Marta, por me darem oportunidade de descobrir “dotes artísticos”; Rogério, pela amizade e pelas discussões espirituais; Thereza, pelo incentivo; Rosa, por ceder equipamentos utilizados nas coletas urinárias de álcool; Pádua, pela amizade e incentivo principalmente no encaminhamento do doutorado; Anicleto, pela preocupação e auxílio nas dosagens bioquímicas; Jamil, pelas excelentes “dicas” e sugestões e por ceder espaço e equipamentos utilizados na segunda fase de experimentos e ao professor Reinaldo pela amizade, pela valorização do meu trabalho e pelas excelentes sugestões.

Aos amigos do Laboratório do Óxido Nítrico por toda a ajuda na segunda fase de experimentos, em especial ao amigo Daniel, não apenas por realizar os experimentos cardiovasculares, mas principalmente, por torcer para que as coisas “fluíssem bem”, por

ficar feliz com os bons resultados e por valorizar meu trabalho, enfim pela enorme ajuda e pela amizade.

Aos demais amigos do departamento, em especial aos amigos dos laboratórios de sistema nervoso central pelo excelente convívio, pelas brincadeiras e pela amizade.

Aos funcionários do departamento de farmacologia, secretárias, bioteristas (Pedro e Redna, especialmente) e serventes que ofereceram as condições necessárias para o desenvolvimento do meu mestrado.

À professora Rosângela e à sua aluna Valdelúcia, do departamento de Bioquímica, pela gentileza em ceder seu laboratório e seus equipamentos para que as dosagens bioquímicas fossem realizadas no período em que o espectrofotômetro da farmacologia estava descalibrado.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário pela gentileza em ceder o espaço e os equipamentos para realização dos primeiros cortes histológicos.

Aos amigos da turma da UFPA, em especial ao pessoal do Laboratório de Neurofisiologia do Sistema Visual, pela amizade e incentivo.

Aos amigos da “terrinha” Castanhal por acreditarem em mim, mais que eu mesmo, às vezes, e por sempre estarem dispostos a dar apoio moral, principalmente nos momentos de “crises depressivas”.

Aos amigos Felipe, Ronaldo, Emanuelle, Simoni, Luciana, Clarissa, Evanir, Ernani, Almir e Adriano que me apoiaram e me incentivaram de alguma forma durante esse tempo em Florianópolis, pelas brincadeiras e pelos momentos de discussões filosóficas.

Às amigas Grazielle e Eliana, pela amizade, pelo apoio enorme e pelas discussões que me ajudaram na escrita do trabalho.

Aos amigos Ricardo, Laydiane, Paula, Natalle, Jairo, Fabiano e Lilian pela força e pela amizade, apesar do tempo e da distância.

Às pessoas que se dedicam à ciência, em especial pesquisadores que se dedicam ao estudo do Sistema Nervoso Central. Aos pesquisadores que estudam modelos de alcoolismo e/ou sistema endocanabinóide, por oferecerem o embasamento teórico para que objetivos fossem determinados, resultados interpretados e discutidos e, conclusões propostas. Gostaria de agradecer em especial à pesquisadora Lena Kristoffersen do “Norwegian Institute of Public Health Division of Forensic Toxicology and Drug Abuse” pela gentileza em enviar seus trabalhos e por se dispor a ajudar e esclarecer dúvidas em relação à dosagem alcoólica, principalmente nas amostras de urina.

À Indústria Farmacêutica Sanofi-Aventis pela doação do antagonista SR141716, essencial para a realização desse trabalho.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESC pelo auxílio financeiro.

Aos animais utilizados nesse estudo que, apesar de serem considerados por alguns seres inferiores a nós, nos auxiliam na compreensão de fenômenos biológicos que ocorrem também em humanos.

Enfim, a todos que foram importantes antes e durante o tempo em que essa dissertação foi desenvolvida. Obrigado a todos!

SUMÁRIO

<u>Lista de abreviações</u>	<u>iv</u>
<u>Lista de Figuras</u>	<u>vi</u>
<u>Resumo</u>	<u>vii</u>
<u>Abstract</u>	<u>viii</u>
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1. <u>Dados históricos.</u>	<u>1</u>
1.2. <u>Farmacocinética do etanol.</u>	<u>4</u>
1.3. <u>Efeitos do álcool sobre os principais sistemas orgânicos.</u>	<u>7</u>
1.4. <u>Efeitos do etanol no sistema nervoso central.</u>	<u>10</u>
1.5. <u>Canabinóides e sistema endocanabinóide.</u>	<u>13</u>
1.6. <u>Modulação dos efeitos do etanol pelo sistema endocanabinóide.</u>	<u>19</u>
1.7. <u>O fenômeno da tolerância.</u>	<u>20</u>
2. <u>OBJETIVOS</u>	<u>24</u>
2.1. <u>Objetivo geral.</u>	<u>24</u>
2.2. <u>Objetivos específicos iniciais.</u>	<u>24</u>
2.3. <u>Objetivos específicos secundários.</u>	<u>24</u>
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>25</u>
3.1. <u>Animais.</u>	<u>25</u>
3.2. <u>Drogas e reagentes.</u>	<u>25</u>

3.3.	<u>Cirurgia estereotáxica.</u>	26
3.4.	<u>Teste do plano inclinado.</u>	27
3.5.	<u>Dosagem alcoólica.</u>	29
3.6.	<u>Registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC).</u>	31
3.7.	<u>Procedimentos experimentais.</u>	32
	<i><u>3.7.1. Experimento 1: efeito da administração sistêmica</u></i>	
	<i><u>do antagonista canabinóide SR141716 na tolerância rápida ao etanol.</u></i>	32
	<i><u>3.7.2. Experimento 2: efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.)</u></i>	
	<i><u>do antagonista canabinóide SR141716 na tolerância rápida ao etanol.</u></i>	33
	<i><u>3.7.3. Experimento 3: efeito da administração do agonista</u></i>	
	<i><u>canabinóide WIN55,212-2 após a administração do antagonista</u></i>	
	<i><u>SR141716 na tolerância rápida ao etanol.</u></i>	34
	<i><u>3.7.4. Experimento 4: efeito da administração de diferentes doses</u></i>	
	<i><u>de etanol na tolerância aguda.</u></i>	35
	<i><u>3.7.5. Experimento 5: efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.)</u></i>	
	<i><u>do antagonista CB1 na tolerância aguda ao etanol.</u></i>	35
	<i><u>3.7.6. Experimento 6: efeito da administração do agonista CB1</u></i>	
	<i><u>após a administração do antagonista na tolerância aguda ao etanol.</u></i>	36
	<i><u>3.7.7. Experimento 7: efeito da administração central do antagonista CB1</u></i>	
	<i><u>na concentração de etanol na urina.</u></i>	36
	<i><u>3.7.8. Experimento 8: efeito da administração central do antagonista CB1</u></i>	
	<i><u>nas alterações cardiovasculares promovidas pelo etanol.</u></i>	37
3.8.	<u>Perfusão e histologia.</u>	37
3.9.	<u>Análise gráfica e estatística.</u>	38

4.	<u>RESULTADOS</u>	40
4.1.	<u>Efeito da administração sistêmica de SR141716</u> <u>na tolerância rápida ao etanol.</u>	40
4.2.	<u>Efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de SR141716</u> <u>na tolerância rápida ao etanol.</u>	41
4.3.	<u>Efeito da administração do agonista canabinóide (WIN 55,212-2)</u> <u>Sobre o efeito do antagonista CB1 na tolerância rápida ao etanol.</u>	43
4.4.	<u>Tolerância aguda para diferentes doses de etanol.</u>	44
4.5.	<u>Efeito da administração i.c.v. de SR141716</u> <u>na tolerância aguda ao etanol.</u>	46
4.6.	<u>Influência do agonista canabinóide (WIN 55,212-2) na redução</u> <u>das concentrações sanguíneas de etanol causada pelo SR141716.</u>	46
4.7.	<u>Efeitos da administração de SR141716</u> <u>na concentração de etanol na urina.</u>	49
4.8.	<u>Efeitos da administração i.c.v. de SR141716</u> <u>nas alterações cardiovasculares promovidas pelo etanol.</u>	50
5.	<u>DISCUSSÃO</u>	52
6.	<u>CONCLUSÕES</u>	67
7.	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	68

LISTA DE ABREVIACOES

<u>2-AG</u>	<u>endocanabinide 2-araquidonilglicerol</u>
<u>Δ^9-THC</u>	<u>delta -9- tetrahydrocannabinol</u>
<u>ADH</u>	<u>enzima álcool dehidrogenase</u>
<u>ALDH</u>	<u>enzima aldedol dehidrogenase</u>
<u>ANOVA</u>	<u>Análise de varincia</u>
<u>bpm</u>	<u>batimentos por minuto</u>
<u>CB1</u>	<u>receptor canabinide CB1</u>
<u>CEBRID</u>	<u>Centro Brasileiro de Informacoes sobre Drogas Psicotropicas</u>
<u>CYP2E1</u>	<u>subtipo de enzima citocromo oxidase</u>
<u>DAG</u>	<u>diacilglicerol</u>
<u>DGL</u>	<u>diacilglicerol lipase</u>
<u>DSM-I</u>	<u>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders I</u>
<u>E</u>	<u>etanol</u>
<u>EPM</u>	<u>erro padrao da media</u>
<u>FC</u>	<u>frequencia cardiaca</u>
<u>GABA_A</u>	<u>receptor ionotropico do cido γaminobutirico (GABA)</u>
<u>G_{i/o}</u>	<u>proteina G inibitoria</u>
<u>HDL</u>	<u>lipoproteinas de alta densidade</u>
<u>i.c.v.</u>	<u>intracerebroventricular</u>
<u>i.m.</u>	<u>intramuscular</u>
<u>i.p.</u>	<u>intraperitoneal</u>
<u>Lyso-PL</u>	<u>2-araquidonil-lisofosfolipidio (precursor do 2-AG)</u>

<u>MEOS</u>	<u>sistema microsômico de oxidação do etanol</u>
<u>NMDA</u>	<u>n-metil-d-aspartato (receptor ionotrópico do glutamato)</u>
<u>PA</u>	<u>pressão arterial</u>
<u>PLC</u>	<u>fosfolipase C</u>
<u>S</u>	<u>salina</u>
<u>SR</u>	<u>antagonista canabinoide SR141716</u>
<u>WIN</u>	<u>agonista canabinoide WIN55,212-2</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <u>Modelo esquemático das reações enzimáticas responsáveis pelo metabolismo hepático do etanol e acetaldeído.</u>	6
Figura 2: <u>Sinalização retrógrada dos endocanabinóides no hipocampo.</u>	17
Figura 3: <u>Distribuição de receptores canabinóides CB1 no cérebro de rato.</u>	18
Figura 4: <u>Teste do plano inclinado.</u>	28
Figura 5: <u>Exemplo de uma curva padrão típica de dosagem alcoólica.</u>	31
Figura 6: <u>Fenômeno da tolerância rápida.</u>	40
Figura 7: <u>Efeito da administração sistêmica de SR141716 na tolerância rápida.</u>	42
Figura 8: <u>Efeito da administração i.c.v. de SR141716 na tolerância rápida.</u>	43
Figura 9: <u>Efeito da administração i.c.v. de SR141716 e WIN55,212-2 na tolerância rápida.</u>	44
Figura 10: <u>Efeito da administração de diferentes doses de etanol na tolerância aguda.</u>	45
Figura 11: <u>Efeito da administração i.c.v. de SR141716 na tolerância aguda ao etanol.</u>	47
Figura 12: <u>Efeito da administração i.c.v. de SR141716 e WIN55,212-2 na tolerância aguda.</u>	48
Figura 13: <u>Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista CB1 na concentração de etanol na urina.</u>	49
Figura 14: <u>Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista CB1 nas alterações cardiovasculares promovidas pela administração sistêmica de etanol.</u>	51

RESUMO

Evidências sugerem que o sistema de neurotransmissão endocanabinóide modula o consumo de álcool. Trabalhos prévios do laboratório mostraram o desenvolvimento de tolerância rápida cruzada entre etanol e Δ^9 -tetrahydrocannabinol, porém pouco se sabe sobre o envolvimento desse sistema de neurotransmissão na tolerância ao etanol. Diante disso, o presente estudo apresentou como objetivo inicial estudar o envolvimento dos receptores canabinóides (CB1) cerebrais nas tolerâncias rápida e aguda ao etanol. Observou-se que a administração sistêmica (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v.) do antagonista CB1 SR141716 (SR) bloquearam o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida por etanol, sendo esse efeito revertido pelo agonista CB1 WIN55,212-2. Nos experimentos de tolerância aguda, a administração i.c.v. de SR reduziu as concentrações plasmáticas de álcool, efeito revertido por WIN55,212-2, sem no entanto interferir no prejuízo motor. Para tentar compreender se a redução das concentrações plasmáticas de álcool era devida a uma maior eliminação da droga, foram realizadas avaliações cardiovasculares e dosagem de etanol na urina. A administração i.c.v. de SR não alterou o volume urinário, porém reduziu a concentração de etanol na urina do grupo tratado com a maior dose (4 μ g). A administração i.p. de etanol reduziu a pressão arterial (PA) de ratos anestesiados, não alterando a frequência cardíaca (FC). A administração i.c.v. de SR (2 μ g) não alterou os valores cardiovasculares basais (PA e FC), porém aumentou significativamente a FC dos animais tratados com etanol. Tomados em conjunto, os dados do presente estudo sugerem um envolvimento importante dos receptores CB1 cerebrais na tolerância e sensibilidade ao etanol, bem como nas alterações cardiovasculares e nas concentrações plasmáticas de etanol.

ABSTRACT

An increasing body of evidence suggests that the endocannabinoid signaling system modulates ethanol consumption. Our previous studies have shown the development of rapid cross tolerance between ethanol and Δ^9 - tetrahydrocannabinol. However there is a paucity of data regarding the involvement of the endocannabinoid system on ethanol tolerance. Thus, the aim of this study is to investigate the involvement of CB1 receptors on development of rapid and acute tolerance to ethanol in rats. It was observed that systemic (i.p.) and intracerebroventricular (i.c.v.) injections of CB1 receptor antagonist SR141716 (SR) blocked rapid tolerance to ethanol, and this effect was reverted by CB1 receptor agonist WIN55,212-2 (WIN). On acute experiments, the i.c.v. injection of SR reduced blood ethanol concentration (BEC), an effect reverted by WIN, without affecting animal motor performance. In order to verify if the reduction in BEC caused by SR was correlated with higher elimination of ethanol, we performed a cardiovascular evaluation and the measurement of urine ethanol concentrations. The i.c.v. administration of SR did not affect urinary volume, but it reduced ethanol urine concentration when used at the higher dose (4 μ g). The i.p. administration of ethanol reduced blood pressure (BP) in anesthetized rats, but it did not altered heart rate (HR). The i.c.v. administration of SR (2 μ g) did not affect basal cardiovascular values, but increased HR of rats treated with ethanol. Taken together, the present results suggest that the endocannabinoid system are involved in development of ethanol tolerance, as well as in cardiovascular changes and ethanol blood concentrations.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dados históricos

O consumo de substâncias psicoativas é praticado pelo homem há milhares de anos, estando associado a questões geográficas, econômicas e sócio-culturais. Dentre as drogas de uso mais antigo destacam-se o álcool etílico (etanol) e os derivados da *Cannabis sativa* (canabinóides) que, segundo estimativas, datam de aproximadamente 10.000 anos atrás.

Acredita-se que a bebida alcoólica teve origem na Pré-História (Masur, 1984) provavelmente durante o período Neolítico com o aparecimento da agricultura. A partir de um processo de fermentação natural, o ser humano passou a consumir e a atribuir diferentes significados ao álcool. Sociedades antigas como celtas, gregos, romanos, egípcios e babilônios registraram de alguma forma o consumo e a produção de bebidas alcoólicas.

O solo e o clima na Grécia e em Roma eram especialmente ricos para o cultivo da uva e fabricação do vinho. Os gregos e romanos conheciam a fermentação do mel e da cevada, porém o vinho era a bebida mais difundida nos dois impérios tendo importância social, religiosa e terapêutica. Na Grécia Antiga, o dramaturgo Eurípedes (484 a.C. - 406 a.C.) mencionou nas “Bacantes” duas divindades de primeira grandeza para os humanos: Deméter, a deusa da agricultura que fornece alimentos sólidos para nutrir os humanos, e Dionísio, o Deus do vinho e da festa (Baco para os Romanos). Apesar do vinho participar ativamente das celebrações sociais e religiosas greco-romanas, o abuso de álcool e a embriaguez alcoólica já eram severamente censurados pelos dois povos (Vallee, 1994).

Os egípcios deixaram documentadas nos papiros as etapas de fabricação, produção e comercialização da cerveja e do vinho. Eles também acreditavam que as

bebidas fermentadas eliminavam germes e parasitas, devendo ser usadas como medicamentos, especialmente na luta contra parasitas provenientes das águas do Nilo.

Na Idade Média, a comercialização do vinho e da cerveja cresceu, assim como sua regulamentação. A intoxicação alcoólica deixou de ser apenas condenada pela igreja passando a ser considerada como pecado por esta instituição.

Durante a Renascença iniciou-se a fiscalização dos cabarés e tabernas, sendo estipulados horários de funcionamento destes locais. Os cabarés e tabernas eram considerados locais onde as pessoas podiam se manifestar livremente e o uso de álcool estava presente nos debates políticos que mais tarde desencadearam a Revolução Francesa.

O fim do século XVIII e o início da Revolução Industrial foram acompanhados de mudanças demográficas e de comportamentos sociais na Europa. Foi durante este período que o uso excessivo de bebida passou a ser visto por alguns como uma doença ou desordem. Na primeira metade do século XIX, estudiosos estabeleceram diferenças entre bebidas destiladas e fermentadas, em especial o vinho. Neste sentido Pasteur, em 1865, não encontrando germes maléficos no vinho, declarou que esta era a mais higiênica das bebidas. No início do século XX, alguns países, como a França, estabeleceram a idade de 18 anos, como mínima para o consumo de álcool. Em janeiro de 1920, o Estado Americano decretou a Lei Seca que teve duração aproximada de 12 anos. Esta Lei proibia a fabricação, venda, troca, transporte, importação, exportação, distribuição, posse e consumo de bebida alcoólica e foi considerada por muitos como um desastre para a saúde pública e economia americanas. Em 1952, a primeira edição do DSM-I (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) incluiu o alcoolismo como doença a ser tratada (adaptado de: CISA - Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. História do Álcool. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br>>. Acesso em 10/12/2005).

Por outro lado, a *Cannabis* era utilizada para a obtenção de fibras, óleo, sementes, consumidas como alimento e por suas propriedades alucinógenas. A planta parece ser originária da China, apesar de outras evidências apontarem para a Ásia Central. O famoso “Pen Tsao Ching”, farmacopéia escrita em 100 d.C., baseada nas compilações de plantas com propriedades farmacológicas do imperador Shen Nung (2737 a.C.), mostra que os chineses já conheciam há alguns milênios as propriedades alucinógenas da *Cannabis*. Nesses períodos, a utilização da planta estava intrinsecamente ligada ao misticismo e ao curandeirismo (Grinspoon, 1995).

Ainda atualmente, a maconha possui grande influência sobre a cultura hindu. Segundo tradição popular da Índia, a planta fora um presente dos deuses aos homens, capaz de provê-los de prazer, coragem e atender a seus desejos sexuais. A planta teria brotado pela primeira vez quando gotas do néctar dos deuses (Amrita) se derramaram sobre a Terra. Nos Himalaias indianos e no Tibet as preparações a base de *Cannabis* encontram grande importância no contexto religioso. Sadhus (homens sagrados) dedicam sua vida à deusa Shiva, não possuem qualquer bem e praticam ioga e meditação, sendo o consumo de maconha parte de seus rituais (adaptado de: Programa Álcool e Drogas (PAD) do Hospital Israelita Albert Einstein. Site Álcool e Drogas sem Distorção. História da Maconha. Disponível em: <www.einsten.br/alcooledrogas>. Acesso em 10/12/2005).

Apesar de bastante antigo, o uso e abuso de etanol e *Cannabis* permanecem nos dias atuais, sendo influenciados por aspectos geográficos e principalmente culturais. Sabe-se que o etanol é a droga psicoativa mais consumida no Ocidente. Entretanto, seu uso é praticamente inexistente no Oriente Médio. No Ocidente o uso de etanol é lícito ao contrário do uso de *Cannabis*. No Oriente Médio ocorre o oposto, o uso de *Cannabis* é

aceito e considerado sagrado, ainda hoje, sendo, contudo, o uso de álcool proibido e punido.

No Brasil, estatísticas do I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas feito pelo CEBRID em 2001 reforçam a influência cultural no consumo de drogas. O álcool é a substância psicotrópica mais consumida no Brasil, apresentando uma prevalência de 68,7% de uso na vida dos entrevistados. Já a maconha é a terceira droga mais usada com prevalência de 6,9%.

Em virtude do uso difundido e abrangente, problemas relacionados ao álcool são mais relatados que os problemas promovidos pelo uso de *Cannabis* no Brasil. Dados do levantamento do CEBRID apontam diversos problemas decorrentes do uso de álcool: tempo gasto em atividades relacionadas à droga (4,4%), frequência de consumo elevada acima da pretendida (9,4%), tolerância mencionada como necessidades maiores da droga para obtenção de efeitos similares (5,8%), riscos físicos na execução de atividades sobre o efeito da droga (6,2%), problemas pessoais relativos ao trabalho, família ou amigos (7,1%) e ainda insucesso nas tentativas de parar ou diminuir o consumo (14,5%) estão presentes na vida de muitos brasileiros.

1.2. Farmacocinética do etanol.

Os efeitos centrais do etanol estão diretamente relacionados aos níveis plasmáticos após o consumo da droga. Existem três aspectos básicos que determinam a farmacocinética do álcool: sua absorção, que ocorre no estômago e principalmente no intestino delgado, sua distribuição pela circulação sanguínea e seu metabolismo e eliminação.

Após administração por via oral, uma parcela do etanol sofre metabolismo de primeira passagem no estômago por ação da enzima álcool desidrogenase gástrica, o restante chega ao trato intestinal onde é facilmente absorvido pelas paredes do intestino delgado, de onde é distribuído por todo o corpo através da circulação sistêmica (Matsumoto & Fukui, 2002; Caballeria, 2003). Após absorção, o álcool sofre metabolismo oxidativo no fígado, sendo transformado em acetaldeído (metabólito tóxico) e posteriormente em acetato (Lieber, 1997; Salaspuro, 1999).

A figura 1 ilustra, de maneira esquemática, as três reações de oxidação responsáveis pelo metabolismo do etanol a acetaldeído, e a reação responsável pela degradação do acetaldeído a acetato. O metabolismo hepático do etanol é catalizado principalmente pela enzima álcool desidrogenase (ADH), apresentando o composto nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD^+) como cofator. Existem diversas isoformas de ADH que variam de classes I a VII, sendo as classes I, II e IV mais eficazes no metabolismo do álcool (Matsumoto & Fukui, 2002; Caballeria, 2003). A conversão do etanol a acetaldeído pela ADH é uma reação de oxidação que reduz o cofator NAD^+ a NADH.

O sistema microsômico de oxidação do etanol (MEOS) constitui o segundo mecanismo capaz de oxidar o álcool. A enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), principal representante deste sistema, converte etanol a acetaldeído através da redução do cofator NAD^+ . Este sistema tem pequena contribuição no metabolismo do álcool quando concentrações plasmáticas são menores que 10 mM, porém pode ter sua atividade aumentada em consequência do consumo de grandes quantidades de álcool, contribuindo com 50% do total do etanol metabolizado com concentrações plasmáticas de 100 mM (Matsumoto *et al.*, 1994). Após uso crônico de álcool, ocorre um aumento na transcrição da

enzima CYP2E1 favorecendo o metabolismo pelo sistema microsômico (Badger *et al.*, 1993). A catalase presente nos peroxissomos também pode converter etanol a acetaldeído, porém apenas experimentos “*in vitro*” têm demonstrado esse fenômeno, sendo descartada a importância dessa via no metabolismo hepático (Matsumoto & Fukui, 2002; Caballeria, 2003). Entretanto, estudos recentes têm mostrado uma participação importante dessa via no metabolismo de etanol no cérebro (Tampier & Quintanilla, 2003).

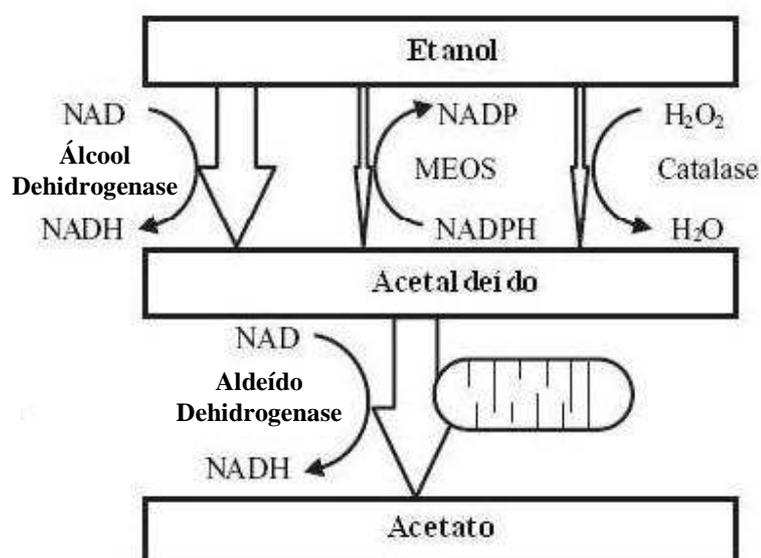


Figura 1: Modelo esquemático das reações enzimáticas responsáveis pelo metabolismo hepático do etanol e acetaldeído. Adaptado de Caballeria, 2003.

O acetaldeído, formado após degradação inicial do etanol, é tóxico ao organismo e sofre rápido metabolismo oxidativo pela forma mitocondrial da enzima aldeído dehidrogenase (ALDH) com redução do cofator NAD^+ a NADH . Assim como a ADH, a ALDH também apresenta diversas isoformas. Algumas isoformas de ADH e ALDH, por apresentarem metabolização menos eficiente de álcool ou acetadeído, estão associadas à

suscetibilidade aumentada aos efeitos desagradáveis e menor risco de desenvolver dependência (Matsumoto & Fukui, 2002; Caballeria, 2003).

1.3. Efeitos do álcool sobre os principais sistemas orgânicos.

Após absorção, o etanol é amplamente distribuído através da circulação sanguínea, exercendo efeitos em praticamente todos os tecidos. Algumas das diversas ações sistêmicas do etanol encontram-se resumidas abaixo.

Grande parcela dos alcoolistas crônicos desenvolve sérios problemas hepáticos. A suscetibilidade a hepatite e cirrose é influenciada por fatores como genética, sexo, dieta e doenças hepáticas co-existent. A maioria dos danos hepáticos é atribuída a produtos provenientes do metabolismo hepático do etanol. No fígado, a lesão tecidual pode ser causada diretamente por bioprodutos do metabolismo ou por inflamação induzida por esses compostos químicos. A exposição do fígado a toxinas bacterianas também pode contribuir para doenças hepáticas decorrentes do uso crônico de etanol. Progressivamente, o dano hepático promovido pelo álcool pode evoluir para fibrose tecidual e cirrose hepática (Maher, 1997).

No tecido pancreático o etanol pode promover inflamações (pancreatites) fatais após uso crônico. Essas inflamações podem ser resultantes do bloqueio dos ductos pancreáticos menores ou da destruição tecidual promovida por enzimas digestivas. Além disso, bioprodutos do metabolismo do etanol podem danificar membranas das células pancreáticas (Apte *et al.*, 1997).

O consumo de etanol pode ser benéfico ou prejudicial ao sistema cardiovascular dependendo da quantidade ingerida e das características do consumo. Diversos mecanismos moleculares e celulares estão envolvidos nos efeitos benéficos do consumo moderado de

etanol. Dentre eles é importante mencionar o aumento da concentração sanguínea de lipoproteínas de alta densidade (HDL), alterações na agregação plaquetária e a estimulação da dissolução de coágulos sanguíneos. Sendo assim, há dados sugerindo que o consumo moderado de etanol pode ser útil na prevenção de doenças cardiovasculares como a doença arterial coronariana e infarto do miocárdio. Embora o consumo leve a moderado de álcool apresente efeito benéfico, consumo crônico pode promover danos ao sistema cardiovascular como distúrbios do músculo cardíaco, alterações do ritmo cardíaco (arritmias) e hipertensão, dentre outros (Zakhari, 1997; Lucas *et al.*, 2005). Agudamente, a administração de etanol promove redução na pressão arterial devido a vasodilatação e diminuição da resistência vascular periférica (Puddey *et al.*, 2001).

Alcoólicos freqüentemente são acometidos por doenças infecciosas e têm maior predisposição a alguns tipos de câncer, indicando que o consumo crônico de etanol pode ser prejudicial ao sistema imunológico. O álcool inibe a fagocitose e a destruição de microorganismos invasores pelos macrófagos, monócitos e neutrófilos. O consumo agudo ou crônico de etanol altera a produção de citocinas (mediadores importantes na resposta imunológica), prejudicando a resposta imune contra agentes específicos e a memória imunológica através de linfócitos T e B. Em alcoólicos crônicos, essas alterações resultam em suscetibilidade aumentada a infecções bacterianas (tuberculose e pneumonia, por exemplo) e virais como AIDS (Szabo, 1997).

Alterações morfológicas e funcionais podem ocorrer nas células sanguíneas após uso excessivo e crônico de etanol. Pode-se observar inibição da produção de células sanguíneas (hematopoese) ou produção de células precursoras anormais incapazes de originar células maduras e funcionais. Alcoolistas freqüentemente apresentam anemia resultante da destruição prematura dos eritrócitos. O etanol também pode interferir com as

células brancas (leucócitos) prejudicando a resposta imune conforme mencionado acima. A função plaquetária e de outros componentes do sistema de coagulação também podem ser afetados pelo uso repetido de álcool (Ballard, 1997).

Alterações no sistema endócrino promovidas pelo álcool podem promover amplas conseqüências no corpo todo. Distúrbios hormonais promovidos pelo etanol podem resultar em anormalidades cardiovasculares e problemas no sistema reprodutor tanto em homens quanto em mulheres. Além disso, podem ocorrer doenças ósseas e distúrbios na função imune decorrentes de alterações hormonais (Emanuele & Emanuele, 1997).

No trato gastrintestinal, o etanol pode afetar diversas estruturas, prejudicando, por exemplo, o funcionamento dos músculos que separam o esôfago do estômago e promovendo azia e desconforto. Danos na mucosa esofágica que aumentam os riscos de câncer nessa estrutura são comuns após uso crônico de etanol. No estômago, o álcool pode interferir com secreção de ácido gástrico e com a atividade das células musculares vizinhas. Prejuízos na contratilidade dos intestinos delgado e grosso podem resultar em diarreia que é freqüente em alcoólicos. O etanol também pode inibir a absorção de nutrientes no intestino delgado e aumentar o transporte de toxinas através das paredes intestinais, promovendo dano hepático e de outros tecidos (Bode & Bode, 1997).

Com uso agudo, o etanol apresenta um efeito diurético bem conhecido devido à inibição da secreção do hormônio antidiurético (Ragland, 1990; Rodrigo *et al.*, 1998). Após uso crônico de etanol, observam-se modificações na estrutura e função renal, prejuízo na habilidade dos rins em regular o volume e a composição dos fluidos e eletrólitos corporais, além de prejuízos no equilíbrio ácido-base. O álcool também pode prejudicar os mecanismos hormonais que regulam a função renal. Alterações ligadas aos danos hepáticos

podem aumentar os efeitos prejudiciais do álcool nos rins podendo resultar em falência renal (Epstein, 1997).

1.4. Efeitos do etanol no sistema nervoso central.

Como visto acima, o etanol pode afetar diversos sistemas orgânicos, entretanto, os efeitos mais marcantes da droga devem-se a ações nos neurônios. O álcool é um depressor, com alguns efeitos semelhantes ao de outras substâncias depressoras como hipnótico-sedativos e anestésicos. Apesar da infinidade de efeitos no cérebro, o etanol apresenta baixa potência, observando-se o início dos efeitos apenas com concentrações plasmáticas de 5–10 mmol/L relativamente elevadas quando comparadas com outras drogas (Davies, 2002). De maneira oposta ao efeito depressor, em concentrações sanguíneas abaixo de 50 mg/dl, o etanol apresenta efeitos semelhantes ao de drogas estimulantes, isso ocorre provavelmente pela inibição de sinapses inibitórias, resultando em sensações de excitação e euforia, podendo promover agitação e agressividade. Com o aumento da concentração plasmática (50 mg/dl – 100mg/dl) observam-se os efeitos depressores: distúrbios no equilíbrio, concentração e tempo de resposta aumentado. Níveis plasmáticos mais elevados (100 – 150 mg/dl) promovem ataxia, dificuldade na articulação de palavras e prejuízos na função motora e mental, incluindo distúrbios na memória de curta duração. Concentrações mais altas levam progressivamente à perda dos sentidos (200 – 300 mg/dl), coma e morte por parada respiratória (acima de 500 mg/dl) (Pohorecky & Brick, 1988).

Em virtude de sua estrutura molecular simples e elevada lipossolubilidade, durante muitos anos acreditou-se que os efeitos do etanol no cérebro fossem devidos a alterações na fluidez da matriz lipídica de membranas neuronais (Tabakoff & Hoffman, 1983). Embora a influência do etanol sobre as membranas celulares seja comprovada, esta

ação ocorre apenas em concentrações muito elevadas de etanol, não sendo observadas com concentrações farmacologicamente relevantes (Wing *et al.*, 1982; Nie *et al.*, 1989).

Sendo assim, nos últimos anos muitos pesquisadores têm se dedicado a estudar ações do álcool em proteínas celulares. Sabe-se atualmente que os principais alvos moleculares do etanol são canais iônicos ativados por ligantes ou voltagem-dependentes (Littleton & Little, 1994; Tabakoff & Hoffman, 1996; Chandler *et al.*, 1998; Harris, 1999), podendo também ser mensageiros intracelulares (Macdonald, 1995; Pandey, 1998).

Dentre os alvos protéicos do etanol destacam-se os receptores GABA_A (Aguayo *et al.*, 2002; Roberto *et al.*, 2003), receptores NMDA (Lovinger *et al.*, 1989; Ron, 2004) e não NMDA (Woodward, 2000; Carta *et al.*, 2003) do glutamato, receptores serotoninérgicos (Lovinger & White, 1991; Lovinger *et al.*, 2000), glicinérgicos (Mihic *et al.*, 1997) e nicotínicos centrais (Hodges *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 1999), bem como canais de cálcio ativados por voltagem (Wang *et al.*, 1994; Widmer *et al.*, 1998) e canais de potássio retificadores acoplados a proteínas G (Kobayashi *et al.*, 1999; Lewohl *et al.*, 1999).

Os efeitos depressores do etanol são devidos principalmente a ações nos dois maiores receptores ionotrópicos presentes no cérebro (GABA_A e NMDA). O etanol aumenta a condutância dos canais GABA_A ao íon cloreto promovendo um aumento de correntes inibitórias e potencializando a neurotransmissão GABAérgica (Allan & Harris, 1986; Suzdak *et al.*, 1986; Weiner & Valenzuela, 2006), efeito revertido pelo antagonista benzodiazepínico Ro15-4513 sugerindo um sítio de ação do etanol nesse sítio modulatório (Suzdak *et al.*, 1986; Harris, 1990). Os receptores NMDA são bloqueados pelo álcool, ocorrendo diminuição do influxo de cátions por esse receptor e redução da excitabilidade neuronal (Michaelis & Michaelis, 1994; Woodward, 2000; Kumari & Ticku, 2000). Além disso, canais de cálcio ativados por voltagem são bloqueados pela administração aguda de

etanol contribuindo ainda mais para diminuição da excitabilidade neuronal, uma vez que esses canais estão envolvidos na fusão e liberação de vesículas de neurotransmissores (Wang *et al.*, 1994; Widmer *et al.*, 1998).

Assim como outras drogas de abuso, o uso crônico de álcool pode levar a dependência, caracterizada pela compulsão pelo uso da droga e perda no controle da ingestão da mesma (Nestler *et al.*, 2004). Diversas neuroadaptações podem ser promovidas pela ingestão crônica de etanol, principalmente nos sistemas GABAérgico e glutamatérgico. Caso o consumo seja interrompido, essas neuroadaptações são desbalanceadas e pode ser estabelecido um quadro clínico conhecido como síndrome de abstinência, caracterizada por efeitos contrários aos promovidos pela droga e devida principalmente a potenciação da neurotransmissão glutamatérgica. Em alcoólicos, a abstinência ao etanol é caracterizada por tremores, convulsões e alucinações, e pelo comportamento compulsivo de busca pela droga (“fissura”), ocorrendo geralmente de 6 a 48 h após a ingestão do último drinque (Hoffman & Tabakoff, 1994). Esses sintomas podem ser fisiológicos e psicológicos e podem originar-se de diferentes substratos neurais (Koob *et al.*, 1992; Myrick & Anton, 1998; Saitz, 1998; Zaleski *et al.*, 2004). *Delirium Tremens* é uma síndrome mais séria que inclui confusão profunda, alucinações e severas instabilidades autonômicas, podendo ocorrer cerca de 48-96 h após o último drinque (Trevisan *et al.*, 1998; DeBellis *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm sido feitos com objetivo de desenvolver drogas eficazes no tratamento do alcoolismo. O dissulfiram é uma das drogas mais antigas e atua inibindo a atividade da enzima aldeído dehidrogenase, aumentando as concentrações de acetaldeído circulantes após a ingestão de bebidas alcoólicas, promovendo assim uma série de efeitos

desagradáveis como náuseas, vômitos, dores de cabeça e rubor facial. Trata-se de um condicionamento aversivo que tem eficácia questionada (Masur & Del Porto, 1982).

Outro composto que tem sido utilizado na clínica é o acamprosato que atua principalmente na redução de sintomas de abstinência através de interações com receptores glutamatérgicos (Boothby & Doering, 2005; De Witte *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2005). Dois compostos que reduzem o reforço positivo e a sensação prazerosa promovida pelo consumo de álcool têm sido propostos como tratamentos úteis da dependência ao etanol. A naltrexona, antagonista opióide em uso clínico desde 1990, atua diminuindo a sensação prazerosa relacionada ao consumo de etanol, diminuindo também os episódios de “recaídas”, provavelmente por inibir vias opioidérgicas que modulam o sistema de recompensa cerebral (Volpicelli *et al.*, 1997; Spanagel & Zieglgansberger, 1997; Modesto-Lowe & Fritz, 2005). Outro composto é o antagonista canabinóide SR141716, que modula vias opioidérgicas, GABAérgicas e dopaminérgicas da via mesolímbica, parecendo também ser útil na redução do consumo de etanol (González *et al.*, 2004; Manzanares *et al.*, 2005).

1.5. Canabinóides e sistema endocanabinóide.

Os compostos derivados de *Cannabis* apresentam diversos efeitos centrais e periféricos. Dentre os principais efeitos periféricos destacam-se hipotensão, taquicardia e imunossupressão. Os efeitos centrais incluem sensações de euforia, relaxamento e alterações sensoriais visuais e auditivas bem como estimulação do apetite, em doses baixas. Já em doses elevadas, ocorre prejuízo motor e cognitivo, efeito hipotérmico e analgésico, não ocorrendo, entretanto, depressão cardio-respiratória (para revisão ver Adams & Martin, 1996; Ameri, 1999; Iversen, 2003; Freund *et al.*, 2003).

Com o isolamento e caracterização do principal composto psicoativo da *Cannabis* (Δ^9 -THC) por Gaoni e Mechoulam, em 1964, diversos pesquisadores sugeriram uma ação inespecífica desta substância sobre membranas celulares neuronais por alterar a fluidez das mesmas (Laurent & Roy, 1975; Roth & Willians, 1979; Bruggemann & Melchior, 1983), de maneira similar ao que era sugerido para compostos de solubilidade elevada como o etanol (mencionado anteriormente) e anestésicos gerais. Entretanto, em 1988, Devane *et al.* detectaram sítios de ligação para o Δ^9 -THC no cérebro (receptores CB1) e, dois anos mais tarde, esses receptores foram clonados por Matsuda *et al.* (1990). Posteriormente, também foram identificados receptores periféricos (receptores CB2) presentes em células do sistema imune (Munro *et al.*, 1993). Após a descoberta de CB1 e CB2, passou-se a assumir que os efeitos do Δ^9 -THC poderiam ser mediados por receptores específicos. A partir de então diversos estudos se voltaram para identificar possíveis ligantes endógenos para esses receptores, fato que aconteceu em 1992 com o ligante anandamida (Devane *et al.*, 1992) e alguns anos mais tarde com o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995) que atualmente são os dois ligantes endocanabinóides mais estudados e bem caracterizados (Di Marzo *et al.*, 1998; Piomelli, 2003).

As etapas bioquímicas envolvidas na biossíntese de anandamida e 2-AG foram caracterizadas, pouco após a identificação desses compostos (Di Marzo *et al.*, 1994; Di Marzo *et al.*, 1996; Bisogno *et al.*, 1997; Stella *et al.*, 1997) e sabe-se hoje que os mesmos são dois derivados de fosfolípidos de membrana originados pela degradação dos mesmos por fosfolipases específicas as quais são ativas pelo íon cálcio. A síntese de anandamida ocorre após clivagem da fosfatidiletalona, catalisada pela enzima N-aciltransferase, ao precursor N-araquidonil-fosfatidiletalona que pode ficar armazenado na membrana e ser convertido a anandamida por uma fosfolipase D ativada por Ca^{2+} (Di Marzo *et al.*, 1994;

Piomelli, 2003). Já o ligante 2-AG parece ter duas vias biossintéticas importantes: uma que degrada fosfatidilinositol a 1,2-diacilglicerol (DAG) (etapa catalisada pela fosfolipase C, PLC) seguida da formação de 2-AG originado a partir do DAG pela catálise por uma diacilglicerol-lipase (DGL). A segunda via bioquímica que pode originar 2-AG também ocorre em duas etapas, uma que é catalisada pela fosfolipase A1 originando 2-araquidonil-lisofosfolípido (Lyso-PL) a partir de fosfatidilinositol e a outra que origina 2-AG a partir de Lyso-PI por ação da Lyso-PLC (Di Marzo *et al.*, 1996; Bisogno *et al.*, 1997; Stella *et al.*, 1997; Piomelli, 2003).

Os endocanabinóides, ao contrário da maioria dos neurotransmissores, não são armazenados em vesículas, porém seu processo de síntese e liberação imediata também é promovido por concentrações aumentadas do íon cálcio. Estes derivados lipídicos são liberados de acordo “com a demanda”, difundindo-se passivamente após serem sintetizados. A duração da ação da anandamida e do 2-AG é muito curta em virtude de um processo de captação e degradação bastante eficiente que utiliza transportadores microssômicos e enzimas específicas. É interessante mencionar que o metabolismo ocorre no meio intracelular, e assim a transmissão endocanabinóide pode ser intensificada por drogas que bloqueiam o transportador microssômico envolvido na captação neuronal desses ligantes (Di Marzo *et al.*, 1998; Piomelli, 2003).

Após síntese e liberação, os endocanabinóides ativam receptores CB1 cerebrais através dos quais exercem seus efeitos inibitórios. Os receptores CB1 pertencem à família de receptores acoplados à proteína G inibitória ($G_{i/o}$), apresentando 7 domínios transmembrana e sítio de ligação extracelular (para o ligante) e intracelular (para a proteína G acoplada). O sistema de neurotransmissão endocanabinóide apresenta função neuromodulatória inibitória atuando como mensageiro retrógrado (ver figura 2). Após a

síntese pelos neurônios pós-sinápticos, os endocanabinóides se difundem passivamente podendo agir em receptores pré-sinápticos e bloquear a entrada de Ca^{2+} . Esse evento celular pode ocorrer através da interação direta de subunidades $\beta\gamma$ da proteína G ou via indireta pela abertura de canais de K^+ e conseqüente hiperpolarização, resultando na inibição da fusão e liberação de vesículas de neurotransmissores (para revisão consultar Di Marzo *et al.*, 1998; Schlicker & Kathmann, 2001; Wilson & Nicoll, 2002; Kreitzer & Regehr, 2002; Piomelli, 2003). Além desses, diversos outros alvos moleculares têm sido sugeridos para os endocanabinóides: a anandamida pode atuar em receptores vanilóides TRPV1, bloquear diretamente canais de cálcio, dentre outras ações (Di Marzo *et al.*, 2002). Alguns pesquisadores sugerem ainda, a existência de um subtipo de receptor ainda não caracterizado (“CB3”) para explicar ações mediadas por agonistas canabinóides que ainda permanecem em camundongos nocautes para o receptor CB1, bem como para explicar ações que não são mediadas por drogas com ações clássicas em CB1 (Piomelli, 2003; Freund *et al.*, 2003).

Os receptores CB1 centrais encontram-se amplamente distribuídos pelo encéfalo (figura 3), sendo os receptores metabotrópicos mais abundantes. Sua localização está condizente com os efeitos psicotrópicos observados após administração de agonistas CB1, sendo presentes em maior densidade em estruturas relacionadas ao controle motor (estriado e córtex cerebelar), no hipocampo (área envolvida em processos de aprendizagem e memória) e ao longo do córtex cerebral explicando a diversidade de efeitos sensoriais. Além disso, a ausência de receptores CB1 no tronco encefálico justifica a ausência de depressão cardiovascular e respiratória mesmo após administração de elevadas doses de agonistas CB1 (Howlett *et al.*, 1990; Breivogel & Childers, 1998; Freund *et al.*, 2003).

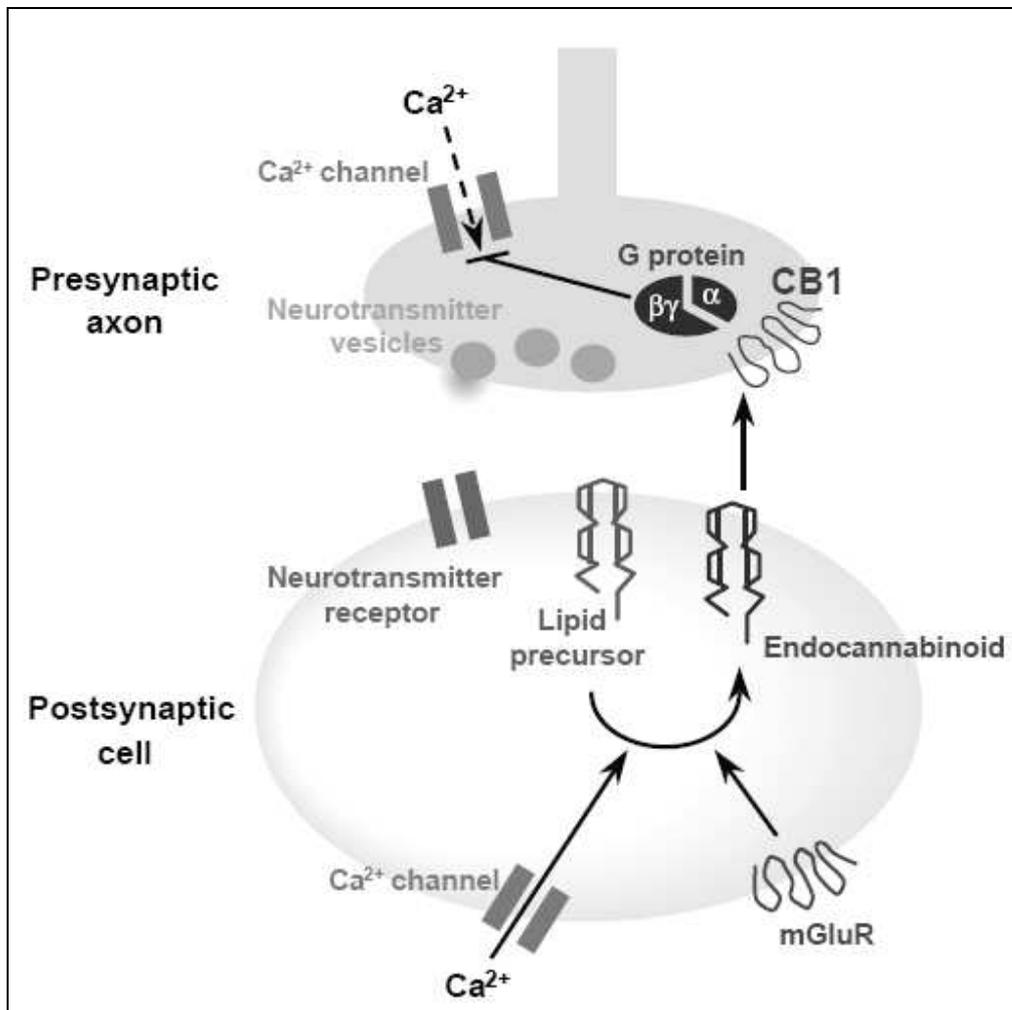


Figura 2: Sinalização retrógrada dos endocanabinóides. No esquema está representada a síntese de endocanabinóides, promovida pela entrada de cálcio no soma do neurônio pós-sináptico. Após a síntese, os endocanabinóides se difundem e podem atuar em receptores CB1 promovendo bloqueio da entrada de cálcio nas terminações axonais pré-sinápticas. Adaptado de Wilson & Nicoll, 2002.

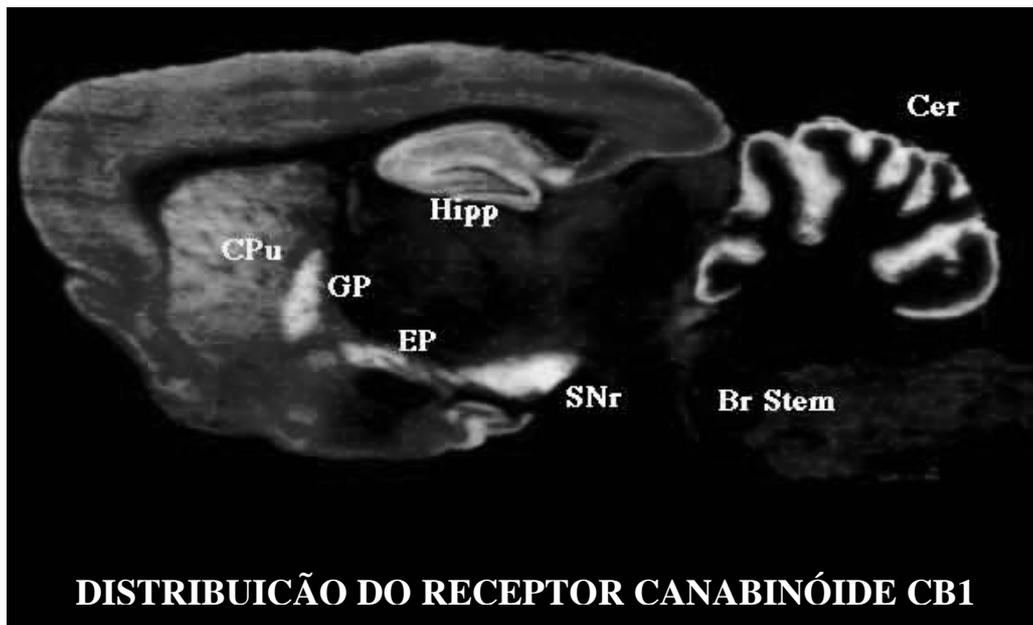


Figura 3: Distribuição de receptores canabinoídes CB1 no cérebro de rato. Regiões com tons mais fortes de cinza representam maiores densidades de receptores CB1 vistas no córtex cerebral e cerebelar (Cer), no hipocampo (Hipp), caudado putâmico (CPu), globo pálido (GP), núcleo entopendicular (EP) e na parte reticulada da substância nigra (SNr). Praticamente não se observam receptores CB1 no tronco encefálico (Br Stem). Adaptado de Herkenhan. Laboratory of Cellular and Molecular Regulation, IRP. National Institute of Mental Health. Disponível em: <<http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/sfn/cannabis.html>>. Acesso em 20/06/2005.

Em relação ao envolvimento do sistema endocanabinoíde na regulação de funções motoras, diversos trabalhos têm mostrado interações desse sistema com os sistemas glutamatérgico, GABAérgico e dopaminérgico, e muitos estudos têm sugerido um envolvimento dos canabinoídes endógenos em distúrbios psicomotores como Parkinson e Coreia de Huntington, sendo considerados alvos farmacológicos potenciais no tratamento dessas doenças (para revisão ver: Rodriguez de Fonseca *et al.*, 1998; Giuffrida *et al.*, 1999; Sañudo-Peña *et al.*, 1999; Giuffrida & Piomelli, 2000; Julian *et al.*, 2003; van der Stelt & Di Marzo, 2003).

1.6. Modulação dos efeitos do etanol pelo sistema endocanabinóide.

Álcool e canabinóides compartilham grande parte de seus efeitos. Etanol e canabinóides promovem sensação de euforia e relaxamento em baixas doses, promovendo prejuízos motores e cognitivos como também hipotermia em doses mais elevadas (Hollister & Gillespie, 1970; Heishman *et al.*, 1997). Apesar dos relatos antigos dos efeitos similares, pouco se compreendia sobre possíveis mecanismos de ação que poderiam explicá-los, acreditava-se que as duas drogas agiam de maneira inespecífica alterando a fluidez de membrana neuronais (Laurent & Roy, 1975; Roth & Willians, 1979; Bruggemann & Melchior, 1983; Tabakoff & Hoffman, 1983).

A compreensão desse processo foi iniciada, talvez por acaso, quando pesquisadores relataram, em trabalhos independentes, que a administração crônica de etanol aumentava concentrações de ésteres de ácidos graxos (produtos provenientes da degradação de lipídios de membrana) em diversos tecidos inclusive no cérebro (Laposata & Lange, 1986; Hungund *et al.*, 1988). Anos mais tarde, após a identificação dos endocanabinóides, Basavarajappa e Hungund (1999) demonstraram que aqueles metabólitos lipídicos com produção aumentada pelo etanol eram utilizados para produção de anandamida em células granulares de cerebelo. Posteriormente, foi demonstrado que o etanol pode inibir a degradação desse endocanabinóide através do bloqueio do transportador microssômico (Basavarajappa *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram quantidades aumentadas do endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG), após exposição crônica ao etanol (Basavarajappa *et al.*, 2000). Com relação aos efeitos do álcool em receptores CB1, sabe-se que o consumo ou tratamento crônico diminui a expressão desses receptores em diversas áreas cerebrais (Basavarajappa *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 2004), além de prejudicar a

transdução do sinal por diminuir a afinidade desse receptor a sua proteína G (Basavarajappa & Hungund, 1999).

Diversos estudos comportamentais sugerem que o sistema endocanabinoide modula os efeitos do etanol no sistema de recompensa cerebral, sendo que o bloqueio do receptor CB1 reduz o consumo (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Freedland *et al.*, 2001; Gessa *et al.*, 2005) e a preferência (Hungund *et al.*, 2003; Poncelet *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) ao álcool, além de inibir a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* promovida pela administração de etanol e relacionada com a sensação de prazer promovida pela droga (Hungund *et al.*, 2003). Diversos estudos têm mostrado ainda, diferenças na expressão de receptores CB1 cerebrais entre linhagens que diferem no consumo (Ortiz *et al.*, 2004; Manzanares *et al.*, 2005) e na sensibilidade (Hungund & Basavarajappa, 2000) aos efeitos do etanol. Além disso, o consumo de álcool e o reforço promovido pela droga são menores em camundongos nocautes para o receptor CB1 (Hungund *et al.*, 2003). Diante dessas evidências, diversos estudos têm sugerido que o sistema de neurotransmissão endocanabinoide modula alguns efeitos do etanol sobre o sistema nervoso central (Hungund & Basavarajappa, 2000; Basavarajappa & Hungund, 2002; Basavarajappa & Hungund, 2005; Manzanares *et al.*, 2005).

1.7. O fenômeno da tolerância

A tolerância a drogas é um fenômeno caracterizado por redução nos efeitos após administração repetida, sendo necessário o aumento da dose para promover os mesmos efeitos iniciais. É um fenômeno adaptativo pelo qual a homeostase do organismo é relativamente mantida na presença da droga. Pode ser promovida por alterações que facilitam a metabolização e eliminação da droga (tolerância disposicional ou

farmacocinética) e por adaptações neuronais (tolerância funcional ou neuroadaptativa) (Snell *et al.*, 1996; Kalant, 1996; Nestler, 2004). Alguns autores mostram evidências que a tolerância comportamental é influenciada por fatores dependentes de aprendizado associativo (condicionamento pavloviano) e aprendizado sob efeito da droga (prática intoxicada) (Larson & Siegel, 1998; Lê & Kalant, 1992). Outro tipo de neuroadaptação ocorrida após uso crônico de etanol é a sensibilização também referida anteriormente como tolerância reversa, na qual ocorre aumento dos efeitos estimulantes do etanol ao contrário da tolerância, em que se observa diminuição dos efeitos depressores (Lister, 1987; Wolffgramm *et al.*, 1990; Quadros *et al.*, 2005).

A tolerância a diversos efeitos do álcool, como ataxia, hipotermia, rubor facial e sonolência se desenvolve rapidamente, mesmo após uma única dose, tornando-se mais evidente com o consumo crônico, sendo que alguns indivíduos chegam a suportar uma dose tão alta quanto 400 mg/dl sem apresentar sintomas grosseiros de sedação. De maneira similar a outras drogas, entretanto, a tolerância não se desenvolve de modo uniforme aos diversos efeitos. Não há tolerância aos efeitos cardio-respiratórios (elevando o risco de morte por superdosagem) e dados demonstrando tolerância aos efeitos reforçadores são controversos (Kalant, 1996; Berridge, 2003; Fadda & Rossetti, 1998).

Segundo o curso temporal em que se desenvolve, a tolerância ao álcool pode ser classificada em aguda, rápida ou crônica. Tolerância aguda refere-se à diminuição do efeito após uma única exposição (Kalant *et al.*, 1971; Radlow, 1994). Tolerância rápida pode ser observada em uma segunda exposição, 8 a 24 horas após o término dos efeitos da primeira (Crabbe, 1979; Khanna *et al.*, 1992; 1996). Já a tolerância crônica pode ser observada ao longo de dias ou semanas de exposição (Kalant, 1971, Littleton, 1980).

A tolerância aguda foi descrita pela primeira vez em 1919 por Mellanby em estudos clínicos. Este pesquisador observou que os efeitos depressores do etanol diminuíram ao longo do tempo, mesmo mantendo os níveis séricos de etanol através de infusão intravenosa (Kalant *et al.*, 1971). Diversos estudos têm se voltado para tentar compreender e elucidar possíveis mecanismos envolvidos neste tipo de tolerância (Khanna *et al.*, 1990; 1991; Tampier *et al.*, 2000). Atualmente, tolerância aguda é definida como um processo neuroadaptativo observado após administração única de etanol, no qual observa-se diminuição dos efeitos promovidos pela droga mesmo com concentrações de etanol circulantes maiores ou equivalentes às observadas no período inicial da análise. Assim, diversos autores têm sugerido que a tolerância aguda envolve processos inatos de adaptação aos efeitos do etanol (principalmente depressores), podendo contribuir para o desenvolvimento de dependência ao etanol (Khanna *et al.*, 1990; 1991; Tampier *et al.*, 2000; Tampier & Quintanilla, 2002).

Já a tolerância rápida foi um modelo experimental proposto pela primeira vez em 1979 por Crabbe para estudar a tolerância ao etanol. O modelo consiste de duas administrações de etanol, verificando-se redução nos efeitos depressores do etanol já numa segunda administração de etanol realizada de 8 a 24h após a primeira (Khanna *et al.*, 1996). Apesar de ser proposta em 1979, foi a partir da década de 1990 que diversos estudos começaram a estudar possíveis mecanismos envolvidos nesse tipo de tolerância (Khanna *et al.*, 1991; 1992; 1993; 1996). Atualmente, já foi demonstrado que diversas características da tolerância rápida se assemelham bastante à tolerância crônica. Dentre essas características comuns, é importante ressaltar o desenvolvimento de tolerância rápida cruzada entre álcool e barbitúricos de baixa solubilidade, similarmente ao que ocorre de forma crônica (Khanna *et al.*, 1991; 1992). Além disso, diversos estudos verificaram que

fatores comportamentais como influência da prática sobre o efeito da droga (prática intoxicada), bem como processos de aprendizado e memória são importantes nesses dois tipos de tolerância, sendo que antagonistas de receptores NMDA bloquearam tanto a ocorrência de tolerância rápida quanto de crônica (Morato & Khanna, 1996). Por isso, o paradigma da tolerância rápida tem sido considerado como um índice da tolerância crônica (Khanna *et al.*, 1991b; Khanna *et al.*, 1992).

Diversos sistemas de neurotransmissão e receptores podem modular a tolerância ao etanol. Estudos evidenciaram envolvimento do receptor NMDA (Khanna & Kalant, 1991; Morato & Khanna, 1996; Khanna *et al.*, 2002), de receptores GABAérgicos (Taberner, 1989; Toki *et al.*, 1996; Homanics *et al.*, 1998; Chandler *et al.*, 1998), serotoninérgicos (Lê *et al.*, 1981; Feller *et al.*, 1993; Khanna *et al.*, 1994, Khanna *et al.*, 2002), opióides (Quintanilla & Tampier, 2000; Varaschin *et al.*, 2005) e recentemente, os sistemas dopaminérgico e adenosinérgico (Batista *et al.*, 2005). No entanto, não se conhece o papel do sistema endocanabinóide no desenvolvimento de tolerância ao etanol.

Muitos trabalhos têm mostrado que o sistema endocanabinóide pode modular o reforço promovido pelo etanol e reduzir o consumo desta droga (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Gessa *et al.*, 2005). Sabendo-se que drogas eficazes na redução do consumo interferem na tolerância ao álcool (Quintanilla & tampier, 2000), considerando que ocorre tolerância cruzada entre etanol e Δ^9 -THC (Newman *et al.*, 1972; Macavoy & Marks, 1975; Sprague & Craigmill, 1976; Marks & MacAvoy, 1989) e ainda, sabendo que o sistema endocanabinóide modula funções motoras (Rodrigues de Fonseca *et al.*, 1998; Giuffrida *et al.*, 1999; Julian *et al.*, 2003; van der Stelt & Di Marzo, 2003), o presente estudo propõe como hipótese que o bloqueio de receptores canabinóides CB1 pode interferir na tolerância rápida e aguda à incoordenação motora produzida pelo etanol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo geral do presente estudo foi verificar o envolvimento dos receptores canabinóides CB1 cerebrais nas tolerâncias rápida e aguda ao efeito de incoordenação motora promovido pelo etanol em ratos.

2.2. Objetivos específicos iniciais:

Os objetivos específicos iniciais deste trabalho foram:

a) Estudar os efeitos da administração central e sistêmica do antagonista canabinóide CB1 (SR141716) na tolerância rápida ao etanol em ratos;

b) Verificar se o efeito do antagonista canabinóide na tolerância rápida ao etanol poderia ser revertido pela administração do agonista canabinóide (WIN55,212-2);

c) Verificar o efeito do bloqueio central dos receptores CB1 pelo SR141716 na tolerância aguda ao etanol em ratos e se esse efeito poderia ser revertido pela administração do agonista canabinóide WIN55,212-2.

2.3. Objetivos específicos secundários:

Diante de alguns resultados observados na primeira série de experimentos, a segunda etapa do presente estudo apresentou como objetivos específicos adicionais:

a) Avaliar os níveis alcoólicos urinários após administração i.c.v. de SR141716;

b) Verificar o efeito da administração i.c.v. de SR141716 nas alterações cardiovasculares promovidas pelo etanol em ratos anestesiados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais:

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, com pequenas variações de idade ($3.0 \pm 0,5$ meses) e peso (330 ± 50 g). Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno branco (42 cm x 24 cm x 17 cm), em número de 6 por caixa, com livre acesso a água e ração granulada. A temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C) e a luminosidade (ciclo de luz 12 /12 h) foram rigorosamente controladas. Com o intuito de minimizar variações circadianas, todos os experimentos comportamentais foram realizados no período de 11 às 18 h. O manuseio dos animais obedeceu às recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, sendo o protocolo experimental submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº 259/CEUA/UFSC, Proc. 23080.001030/2001-85).

3.2. Drogas e reagentes:

Etanol foi obtido da Merck (Hawthorne, NY, EUA). TRIS (hidroximetil) amino metano, Tween 80 P.S. (Polissorbato 80), hidrato de cloral e azul de Evans foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro). Formaldeído solução (HCHO) e ácido perclórico (HClO_4 , PA 69-72%) foram obtidos da F. Maia Ind. E Com. Ltda. Solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0.9%) foi obtida do Lab. Tayuma Ltda. Resina acrílica e líquido acrílico autopolimerisáveis foram obtidos da Dental VIPI Ltda, Ind. e Com. de Prod. Odont. Heparina sódica foi obtida da Cristália Prod, Quim. Farm. Ltda. Cloridrato de lidocaína a 3% com norepinefrina 1:5000 foi obtido da Probem Prod. Farm.

Ltda. Dopaser (Xilazina, 200 mg/ 10 ml) e Dopalen (ketamina, 1000 mg/10 ml foram obtidos da VetBrands do Brasil (Sespo Indústria e Comércio Ltda., Jacareí, SP). SR141716 (Rimonabant) foi gentilmente cedido pela Sanofi-Aventis. WIN-(+)-55,212-2, ADH (Alcohol Dehydrogenase, 15000UI), β -NAD (β -nicotinamide adenine dinucleotide) e salina tamponada (Phosphate buffered saline tablets, 0,01M,) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

As drogas administradas por via intracerebroventricular foram diluídas com Tween 1% em salina tamponada e administradas (num volume de 1 μ L) com o auxílio de um injetor de aço inox com 11 mm de comprimento e 0,3 mm de espessura acoplado a um tubo de polietileno (P100) e microseringas (Hamilton Co., 10 μ L, Reno, NV, EUA) conectadas a uma bomba de infusão (modelo BI-2200, Insight, Ribeirão Preto, SP). Todas as microinjeções foram realizadas numa taxa de infusão constante de 2 μ L/min e esperou-se 30 s após a injeção para retirada do injetor como medida de assegurar dispersão da solução no cérebro. Em todos os experimentos o etanol foi diluído em solução salina numa concentração de 14% p/v e administrado por via intraperitoneal.

3.3. Cirurgia estereotáxica:

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (75 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) administrada num volume de 1,5 ml/Kg via intraperitoneal (i.p.), doses adaptadas de Jho *et al.*, 2003. Após perda total dos reflexos, fez-se a tricotomia na cabeça seguida de imobilização dos animais em um aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA), a calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O perióstio foi retirado e a calota craniana secada com H₂O₂ a 10%. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (nº 6) foram feitos dois furos na

calota craniana para fixação de parafusos. Em seguida, um terceiro furo foi feito para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral direito, sendo o posicionamento da mesma calculado por meio de estimativas em relação ao bregma (ponto de encontro entre as suturas sagital e lambdóide utilizado como referencial anatômico). As coordenadas utilizadas (AP -0.8 mm, ML -1.5 mm e DV -3.5 mm) tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos & Watson (1997) e foram ajustadas ao peso do animal.

Cânulas de aço inoxidável de 10 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo, previamente confeccionadas a partir de tubos de aço (Acerinox Ind. e Com. de Aço Inox S/A., São Paulo – SP), foram introduzidas no ventrículo cerebral direito. Após implantação, a cânula e os parafusos foram fixados ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Mandris de 0,3 mm de diâmetro foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação dos animais. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia, posteriormente alojados em gaiolas específicas com água e ração *ad libitum* e acompanhados diariamente até a realização dos experimentos uma semana após a cirurgia estereotáxica.

3.4. Teste do plano inclinado:

Nos experimentos comportamentais, o prejuízo motor promovido pelo etanol foi avaliado no teste do plano inclinado (Arvola *et al.*, 1958), modificado por Quintanilla & Tampier (2000). O aparato consiste em uma plataforma retangular móvel recoberta por uma grade metálica que é inclinada manualmente de 0 a 90° num intervalo aproximado de 5 segundos. No momento do teste, o animal foi colocado sobre a grade tendo o focinho voltado para a parte de cima. Uma parede de acrílico transparente evita a saída do animal

da plataforma, permitindo ao observador verificar o ângulo de queda do animal (figura 4). Posteriormente, este ângulo foi transformado num índice de prejuízo motor percentual de acordo com a equação matemática:

$$\text{Prejuízo motor (\%)} = \frac{\text{Basal} - a}{\text{Basal} - \alpha} \times 100$$

Onde: a = ângulo de queda do animal no momento do teste;

α = ângulo de queda de um animal anestesiado (aproximadamente 36°);

Basal = ângulo de queda antes de qualquer tratamento (normalmente 90°)

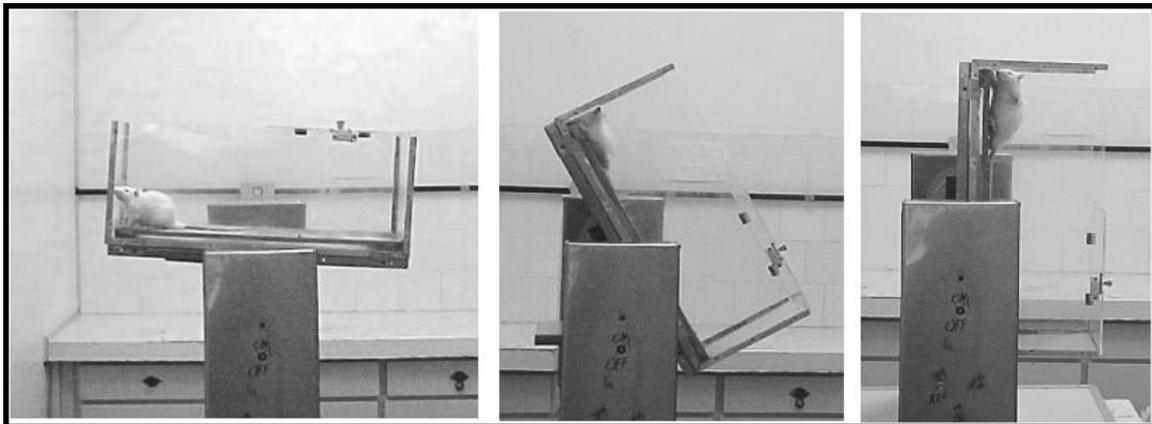


Figura 4: Teste do plano inclinado. O aparato consiste em uma grade metálica inclinada manualmente de 0 a 90° em relação ao plano horizontal em aproximadamente 5 s. O ângulo de queda foi verificado e convertido em um índice de prejuízo motor percentual. No exemplo mostrado, observa-se o desempenho de um animal antes de qualquer tratamento, permanecendo agarrado à grade metálica mesmo na inclinação máxima de 90° correspondente a uma ausência de prejuízo motor (prejuízo motor (%) = 0).

3.5. Dosagem alcoólica:

O método utilizado para dosagem de etanol foi modificado e adaptado de outros trabalhos (Kristoffersen *et al.*, 2005; Kristoffersen & Smith-Kielland, 2005).

Imediatamente após a coleta, amostras de 50 µL de sangue ou de urina foram colocadas em tubos plásticos contendo 1 ml de uma solução de ácido perclórico a 3% para precipitação de proteínas. Em seguida, os tubos foram vedados com parafilme e armazenados à temperatura de 4° C até o momento da dosagem. No dia da dosagem alcoólica, as amostras foram centrifugadas a 5000 RPM durante 5 minutos em uma centrífuga com rotor de “*ependorf*” (Z 320, HERMLE, Labortechnik GmbH, Alemanha). Após a centrifugação das amostras, uma solução contendo 1 mg de enzima álcool desidrogenase (15000 UI, Sigma, EUA) e 100 mg de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (β-NAD⁺, Sigma, EUA) foi preparada em 100 ml de tampão TRIS 0.5 M pH= 8,8. Para estimativa das concentrações de etanol presentes nas amostras, a cada dia de dosagem, foi realizada uma curva padrão com 8 concentrações da “solução-padrão” contendo concentrações conhecidas de etanol (39,5 - 553 mg/dl) diluídas em água destilada.

Após a centrifugação das amostras e preparo das “soluções-padrão”, um volume de 50 µL (similar ao das mostras) de água destilada (branco) ou de cada solução padrão foi colocado em tubos plásticos com ácido perclórico. Para a dosagem, 40 µL de cada solução (branco, soluções padrões, ou sobrenadante de cada amostra centrifugada) foram colocados em tubos contendo 1 ml da solução que continha enzima (ADH) e cofator (β-NAD⁺) e agitados em seguida. Depois de 15 minutos, foi realizada a leitura no espectrofotômetro (Spectrophotometer U-2001, Hitachi) no comprimento de 340 nm (UV) começando pelos brancos em duplicada onde foi “zerada” a leitura para descartar absorbâncias inespecíficas.

Depois disso, foi medida a densidade óptica de cada solução, começando pelos padrões (em duplicata) seguidos das amostras a serem dosadas.

Ao final de cada dosagem os valores de densidade óptica dos padrões foram analisados juntamente com suas concentrações conhecidas e foram feitas análises de regressão linear simples no programa InStat[®] 3.01 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA) com o objetivo de verificar se os dados apresentavam uma inclinação de 45° típica de uma regressão linear. A análise de pontos também foi realizada, sendo que curvas com valores de $r^2 < 0,98$ foram desconsideradas e as amostras novamente dosadas. O método utilizado na dosagem consiste na conversão de álcool a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase, na presença da forma oxidada do cofator que é reduzida na reação enzimática.

Concentrações crescentes de etanol estão diretamente relacionadas com densidades ópticas maiores devido ao aumento da forma reduzida do cofator. Ocorre uma estabilização da reação cerca de 10 minutos após o início da mesma conforme demonstrado por alguns estudos (Kristoffersen *et al.*, 2005). Sendo assim, a leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro 15 minutos após o início da reação. A validação do método já foi demonstrada mesmo para detecção de concentrações muito baixas de etanol, sendo utilizado como rotina em análises toxicológicas em amostras de sangue e/ou urina de seres humanos (Kristoffersen & Smith-Kielland, 2005). Na figura 5, encontra-se demonstrada a representação gráfica de uma “curva-padrão” típica.

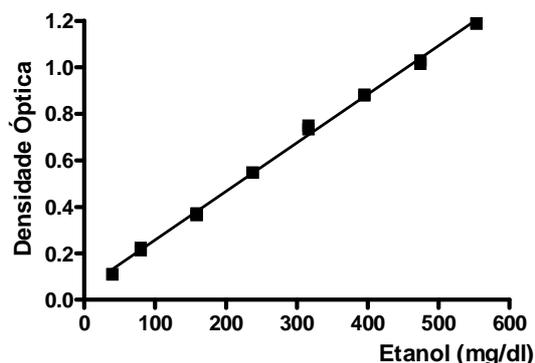


Figura 5: Exemplo de uma curva padrão típica de dosagem alcoólica ($r^2 = 0.9977$). No eixo das ordenadas representada a densidade óptica e no eixo das abscissas representada a concentração de etanol em mg/dl.

3.6. Registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC):

Para os registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg) injetada por via intramuscular (i.m.). A associação dessas drogas foi capaz de promover uma anestesia profunda, sem nenhuma depressão cardiovascular ou respiratória aparente. Doses de reforço (30 e 7 mg/Kg, i.m., respectivamente de ketamina e xilazina) foram administradas a cada 60 minutos com o objetivo de manter o estágio profundo de anestesia.

Após a perda total dos reflexos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36° C), recebendo administração intraperitoneal (i.p.) do anticoagulante heparina sódica (30 UI, diluída em salina tamponada), com o objetivo de prevenir a formação de coágulos e obstrução das cânulas. Para facilitar a respiração espontânea, foi realizada a traqueotomia em todos os animais. Em seguida, a artéria carótida esquerda foi localizada e separada, de maneira rápida e cuidadosa, do nervo vago e dos tecidos subjacentes. O fluxo sanguíneo da carótida foi interrompido na extremidade distal através de ligadura com fio de sutura e o fluxo da

extremidade proximal foi temporariamente suprimido por compressão com uma pinça curva. Na região medial da porção “clampeada” da carótida, foi realizado um pequeno corte que serviu como via de inserção para um cateter de polietileno (Angiocath[®], nº 19) devidamente heparinizado e amarrado firmemente na artéria. Posteriormente, o cateter de polietileno foi conectado a um transdutor de pressão acoplado ao equipamento de análise de PA e FC Digi-Med (modelo 190, NY, EUA). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mmHg) e de frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados a cada 10 segundos em um computador (sistema operacional Windows 98[™], Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração Digi-med (Modelo 200).

Os resultados foram expressos como variações da pressão arterial média (Δ PA, em mmHg) e da frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) em intervalos de 10 minutos, calculados em relação aos valores basais estáveis antes da administração de qualquer droga. Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados com injeção intracardíaca de altas doses de xilocaína.

3.7. Procedimentos experimentais:

3.7.1. Experimento 1: efeito da administração sistêmica do antagonista canabinoide SR141716 na tolerância rápida ao etanol.

Inicialmente foi realizado um experimento para verificar se nossos dados relativos à tolerância rápida estavam compatíveis com outros dados obtidos no laboratório. No primeiro dia de experimento (dia 1), após habituação e pesagem dos animais, o desempenho basal dos mesmos foi verificado no plano inclinado. Em seguida foram

divididos em dois grupos que receberam etanol (2,7 g/Kg) ou salina i.p. Após 30, 60 e 90 minutos cada animal foi testado no plano inclinado. Os animais retornaram às gaiolas e 24h após, foram avaliados antes e 30, 60 e 90 minutos após receberem etanol 2,7 g/Kg.

Experimentos seguintes foram realizados para avaliar o efeito do SR141716 sobre a tolerância rápida. No primeiro dia de experimento (dia 1), após habituação e pesagem dos animais, o desempenho basal dos mesmos foi verificado no plano inclinado. Em seguida, os animais foram divididos em 4 grupos que receberam injeção intraperitoneal (i.p., 1 ml/Kg) de veículo (Tween 80 1% em solução fisiológica) ou antagonista canabinóide CB1 (SR141716, doses 0,5; 1,0 ou 2.0 mg/Kg). Após 15 minutos, cada grupo foi subdividido em dois (totalizando 8 grupos, N = 10 – 13 cada) que recebeu, também por via i.p., salina (S) ou etanol (E, 2,7 g/Kg). O prejuízo motor promovido pela administração sistêmica de etanol foi avaliado 30, 60 e 90 minutos após sua administração. Depois de 24 h (dia 2), após conferida a medida basal, todos os animais receberam apenas etanol (2,7 g/Kg, i.p.) e foram novamente testados no plano inclinado nos mesmos intervalos avaliados no primeiro dia (30, 60 e 90 min). As doses de etanol foram selecionadas de experimentos prévios do laboratório (Wazlawik & Morato, 2002; 2003) e as doses do antagonista CB1 foram selecionadas da literatura (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 2002).

3.7.2. Experimento 2: efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) do antagonista canabinóide SR141716 na tolerância rápida ao etanol.

Uma semana após a recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais foram habituados e pesados na sala experimental, tendo seus mandris cuidadosamente retirados com o auxílio de um pequeno alicate. Para minimizar interferências do estresse devido à manipulação, esperou-se mais 5 minutos até a realização do teste no plano inclinado para

verificação da medida basal. Em seguida os animais foram divididos em dois grupos que receberam por via i.p. salina (S) ou etanol (2,7 g/Kg). Decorridos 5 minutos da injeção sistêmica, cada um dos grupos foi subdividido em 4 (totalizando 8 grupos, N = 8 – 15 cada), recebendo injeção intracerebroventricular de veículo (Tween 80 1%, em salina tamponada, PBS) ou antagonista CB1 (SR141716 nas doses de 0,5; 1,0 ou 2,0 µg). As avaliações no plano inclinado ocorreram 30, 60 e 90 minutos após a injeção sistêmica. No segundo dia de experimento (dia 2), após verificada a medida basal, todos os animais foram tratados com etanol (2,7 g/Kg, i.p.) e novamente testados no plano inclinado nos mesmos intervalos do primeiro dia.

3.7.3. Experimento 3: efeito da administração do agonista canabinoide WIN55,212-2 após a administração do antagonista SR141716 na tolerância rápida ao etanol.

Após a realização da rotina experimental descrita acima e verificação da medida basal no plano inclinado, os animais foram divididos em 2 grupos que receberam injeção sistêmica de salina ou etanol (2,7 g/Kg, i.p.). Em seguida cada grupo foi subdividido em 4 (totalizando 8 grupos, N = 8 – 12 cada) e recebeu duas injeções intracerebroventriculares: 1ª - (5 min após a injeção sistêmica): veículo (Tween 80 1% em PBS) ou antagonista CB1 (SR141716, 1 µg) e 2ª - (imediatamente após a anterior): veículo (Tween 80 1% em PBS) ou agonista CB1 (WIN55,212-2, 1 µg). O desempenho no plano inclinado foi avaliado conforme nos experimentos anteriores (30, 60 e 90 min após a injeção de etanol). No dia 2, apenas etanol (2,7 g/Kg, i.p.) foi administrado a todos os animais e os testes no plano inclinado foram repetidos.

3.7.4. Experimento 4: efeito da administração de diferentes doses de etanol na tolerância aguda.

De maneira similar aos experimentos prévios de tolerância rápida do laboratório (Wazlawik & Morato, 2002; 2003), os primeiros estudos de tolerância aguda foram realizados para selecionar doses de etanol que fossem adequadas para estudar o fenômeno no modelo do plano inclinado. Para isso, os animais foram divididos em 3 grupos (N = 8 cada) e receberam por via intraperitoneal (i.p.) 2,5; 2,7 ou 3,0 g/Kg de etanol. Após as injeções foram testados por cinco ocasiões a cada 15 minutos no plano inclinado e, imediatamente a cada teste, foram coletadas amostras de sangue a partir da cauda dos animais com o auxílio de uma lâmina de bisturi e capilares heparinizados de 50 µL (pipetas pré-calibradas, 50 µL, Modulohm A/S, Dinamarca). Os valores obtidos no plano inclinado foram convertidos para prejuízo motor percentual (ver acima) e as amostras de sangue foram armazenadas para posterior dosagem alcoólica segundo método descrito acima.

3.7.5. Experimento 5: efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) do antagonista CB1 na tolerância aguda ao etanol.

Para verificar um possível envolvimento dos receptores CB1 cerebrais na tolerância aguda ao etanol, foram utilizados 4 grupos experimentais (N = 7 – 11 cada) que receberam injeção sistêmica de 3,0 g/Kg de etanol e injeções intracerebroventriculares (5 minutos após a injeção sistêmica) de veículo (Tween 80 1% em PBS) ou antagonista CB1 (SR141716 nas doses de 0,5; 2,0 ou 4,0 µg, i.c.v.). Os testes no plano inclinado, bem como a coleta de amostras de sangue para posterior dosagem alcoólica foram realizados a cada 15 minutos se estendendo até 75 minutos após a administração de etanol.

3.7.6. Experimento 6: efeito da administração do agonista CB1 após a administração do antagonista na tolerância aguda ao etanol.

Com o objetivo de verificar se o efeito do antagonista canabinoide sobre os experimentos de tolerância aguda poderiam ser revertidos pelo agonista, foram realizados experimentos com 4 grupos experimentais (N = 7 – 11 cada). Todos os animais receberam injeção sistêmica de 3,0 g/Kg de etanol e foram tratados após 5 minutos (via i.c.v.) com: veículo (Tween 80 1% em PBS), veículo + SR141716 (2 µg), veículo + WIN55,212-2 (1 µg), ou SR141716 (2 µg) + WIN55,212-2 (1 µg). Cada injeção i.c.v foi administrada num volume de 1µL. Os testes no plano inclinado e coletas de sangue foram realizados a cada 15 minutos conforme os outros experimentos de tolerância aguda.

3.7.7. Experimento 7: efeito da administração central do antagonista CB1 na concentração de etanol na urina.

Para verificar um possível efeito da administração central do antagonista CB1 sobre a eliminação de etanol na urina. Ratos foram divididos em 3 grupos (N = 5 – 10 cada), que receberam injeção sistêmica de etanol (3,0 g/Kg). Após 5 minutos das injeções i.p., foram administrados intracerebroventricularmente veículo (Tween 80 1% em PBS), ou SR141716 (2 ou 4 µg). Após as injeções i.c.v., os animais foram colocados em gaiolas metabólicas durante 75 minutos (mesmo intervalo de tempo dos experimentos de tolerância aguda), sendo amostras de urina coletadas em tubos falcom ao final do período. Após a coleta, os volumes urinários foram estimados por diferenças entre os tubos, pesados antes e depois do experimento. A densidade da urina foi considerada como 1 mg/ml, logo, cada grama de peso foi estimada como 1 ml de urina. Amostras de 50 µL de urina foram colocadas em tubos contendo ácido perclórico para posterior dosagem alcoólica.

3.7.8. Experimento 8: efeito da administração central do antagonista CB1 nas alterações cardiovasculares promovidas pelo etanol.

Com o intuito de verificar se a administração central (i.c.v.) do antagonista CB1 SR141716 poderia interferir nas alterações cardiovasculares promovidas pelo etanol, foram realizados experimentos de registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos anestesiados (N = 3 – 7 por grupo), conforme descrito acima. Para isso, após estabilização do registro, foram realizadas injeções sistêmicas de etanol ou salina e 5 minutos após as injeções sistêmicas, injeções i.c.v. de veículo (Tween 80 1% em PBS) ou SR141716 (2 µg) foram administradas num volume de 1 µL. As alterações cardiovasculares foram acompanhadas ao longo de 80 minutos após a primeira injeção, tendo sido considerados os valores em intervalos de 10 minutos e calculadas diferenças (Δ PA e Δ FC) em relação aos valores basais de cada animal.

3.8. Perfusão e histologia:

Após a realização dos experimentos que fizeram uso de microinjeções cerebrais, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral e perfundidos transcardiacamente com solução fisiológica (NaCl 0,9%) seguida de formaldeído a 4% para fixação dos tecidos. Ao término da perfusão, 5 µL de corante azul de Evans (0,1%) foram injetados pelas cânulas guias, os cérebros foram removidos e pós-fixados em formaldeído 4% por 24 h. Posteriormente à pós-fixação, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foram feitos cortes coronais nos locais de implante das cânulas para verificar o posicionamento correto das mesmas. Os acertos foram visualizados, sem o auxílio de qualquer equipamento de aumento, como um preenchimento completo do ventrículo lateral direito pelo corante administrado. Nos experimentos de pressão arterial, o acerto das cânulas foi verificado no

tecido fresco após eutanásia dos animais e administração do corante. Eventuais erros no posicionamento das cânulas implicaram em desconsideração dos resultados obtidos.

3.9. Análise gráfica e estatística:

Os resultados de todos os experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A confecção dos gráficos foi feita utilizando-se o programa Graph Pad Prism[®] 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica[®] para Windows 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Nos experimentos realizados para demonstrar a tolerância rápida foi utilizada análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, com tratamento (salina ou etanol) como variável independente, prejuízo motor como variável dependente e o número de exposições ao modelo nos dois dias foi considerado como fator de repetição. Nos demais experimentos de tolerância rápida foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas, com o tratamento como variável independente, o prejuízo motor máximo em cada dia como variável dependente e a exposição ao modelo nos dia 1 e 2 considerada como fator de repetição.

Nos experimentos de tolerância aguda foi usada ANOVA para medidas repetidas para comparações temporais no prejuízo motor e na concentração de etanol no sangue, sendo o tratamento considerado como variável independente e o tempo como fator de repetição. Para comparações entre grupos, utilizou-se ANOVA de uma via, tendo o tratamento como variável independente e a área sob a curva total (de concentrações alcoólicas sangüíneas ou prejuízo motor) como variável dependente.

Nos experimentos de dosagem de etanol na urina foi utilizada ANOVA de uma via, tendo o tratamento como variável independente e volume urinário ou concentração alcoólica na urina como variáveis dependentes.

Os experimentos que observaram os parâmetros cardiovasculares (PA e FC) foram analisados estatisticamente por ANOVA de medidas repetidas, tendo o tratamento como variável independente e tempo como fator de repetição. Em todos os experimentos utilizou-se o teste de *post hoc* LSD de Fisher.

4. RESULTADOS:

4.1. Efeito da administração sistêmica de SR141716 na tolerância rápida ao etanol.

Os primeiros experimentos foram realizados para mostrar o fenômeno da tolerância rápida na ausência de qualquer outro tratamento. Conforme mostrado na figura abaixo, observou-se que apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor no primeiro dia, ocorrendo uma diminuição significativa deste prejuízo ao longo do tempo nas exposições seguintes. No segundo dia, com a administração de etanol a todos os animais, observou-se que os animais tratados com etanol pela primeira vez apresentaram prejuízo elevado diferindo significativamente do grupo que recebeu etanol também no dia anterior. Isto sugere que os animais ficaram tolerantes à segunda exposição ao etanol.

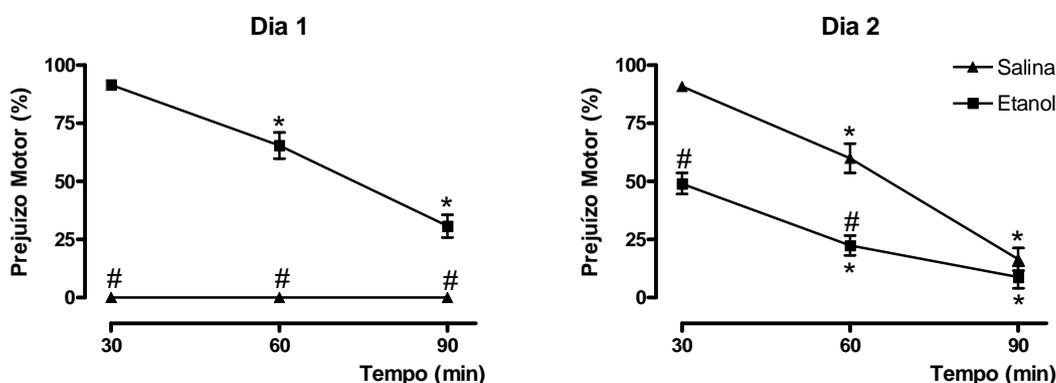


Figura 6: Fenômeno da tolerância rápida. O tratamento com etanol (2,7 g/Kg) promoveu um elevado prejuízo motor nos animais em relação ao grupo tratado com salina. No segundo dia, os animais tratados com etanol pela segunda vez apresentaram um prejuízo significativamente menor que o grupo tratado com salina no primeiro dia. (*) $p < 0,05$ em comparação com o primeiro momento do teste (30 min), (#) $p < 0,05$ em comparação ao outro grupo. ANOVA seguida de teste LSD. Dados expressos como média \pm EPM.

Nos experimentos seguintes foi considerado apenas o prejuízo motor máximo (30 minutos após tratamento) em cada dia como medida comportamental válida para análise de tolerância rápida de acordo com outros estudos do laboratório (Wazlawik & Morato, 2002; 2003; Varaschin *et al.*, 2005). Na figura 7, observa-se que no primeiro dia de experimento apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor [$F_{(1, 90)} = 541, 58$; $p < 0,01$], sendo que o tratamento com antagonista CB1, não apresentou efeito sobre o desempenho motor nas doses administradas [$F_{(3, 90)} = 1,47$; $p = 0,23$]. No entanto, este antagonista (doses de 1 e 2 mg/Kg) interferiu com o prejuízo promovido pelo etanol nos animais tratados com etanol pela segunda vez no dia seguinte na ausência de quaisquer pré-tratamento [$F_{(3, 90)} = 3,76$; $p = 0,01$]. Esses resultados sugerem que o SR141716 bloqueia a tolerância rápida ao efeito de incoordenação motora promovido pelo etanol de modo dependente de dose.

4.2. Efeito da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de SR141716 na tolerância rápida ao etanol.

A figura 8 ilustra o efeito da administração i.c.v. do antagonista CB1 sobre a tolerância rápida ao etanol. Observou-se que no primeiro dia de experimento apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor [$F_{(1, 84)} = 212,28$; $p < 0,01$] e o tratamento com antagonista CB1 não afetou o desempenho motor nas doses administradas [$F_{(3, 84)} = 0,96$; $p = 0,42$]. Entretanto, esta droga promoveu efeito no prejuízo motor promovido pelo etanol [$F_{(3, 84)} = 2,80$; $p = 0,04$] no segundo dia. No dia 2 quando todos os animais receberam apenas injeção i.p. de etanol, observou-se redução significativa no prejuízo motor nos animais tratados com etanol e veículo (i.c.v) no primeiro dia (tolerância rápida), não ocorrendo esse fenômeno nos animais tratados com etanol e SR141716 (0,5,

1,0 ou 2,0 μg) sugerindo um bloqueio da tolerância rápida ao etanol promovido pela administração i.c.v. do antagonista CB1. Nas doses empregadas o bloqueio foi semelhante.

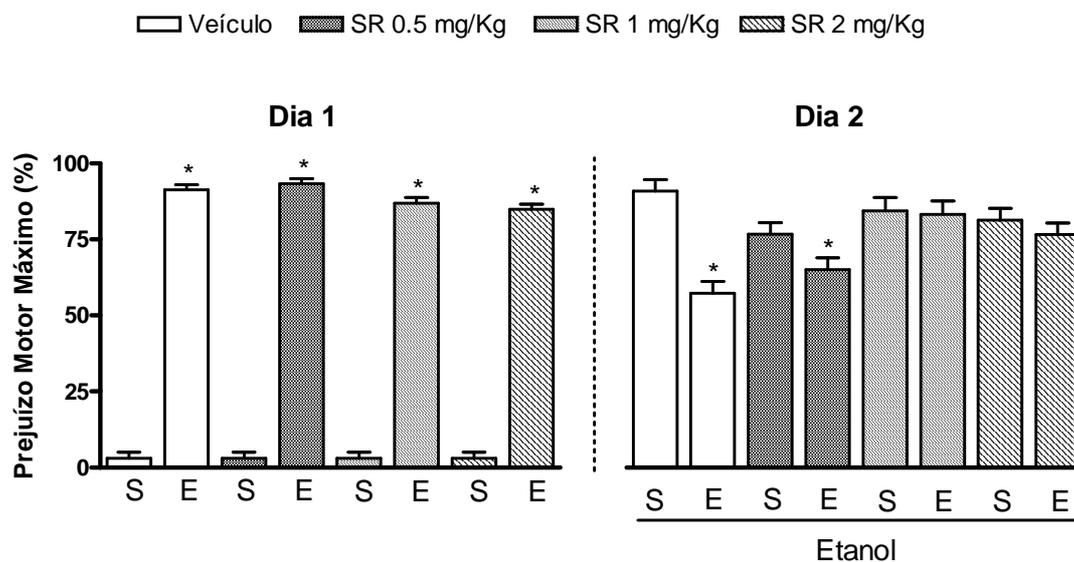


Figura 7: Efeito da administração sistêmica de SR141716 na tolerância rápida. No dia 1, o tratamento com 2,7 g/Kg de etanol (E) promoveu um elevado prejuízo motor nos animais em relação ao grupo tratado com salina (S). No segundo dia, os animais pré-tratados com veículo ou com a menor dose de antagonista (0,5 mg/Kg), apresentaram prejuízo reduzido quando tratados com etanol pela segunda vez, evidenciando a tolerância rápida. Porém o pré-tratamento com o antagonista CB1 nas maiores doses (1 e 2 mg/Kg) bloqueou o desenvolvimento de tolerância sendo evidenciado pelo elevado prejuízo motor no segundo dia, mesmo nos animais tratados com etanol pela segunda vez.. (*) $p < 0.05$ em comparação ao respectivo controle. ANOVA com fator tempo (dia 1 e dia 2) como medida repetida, seguida de teste LSD. Dados expressos como média \pm EPM.

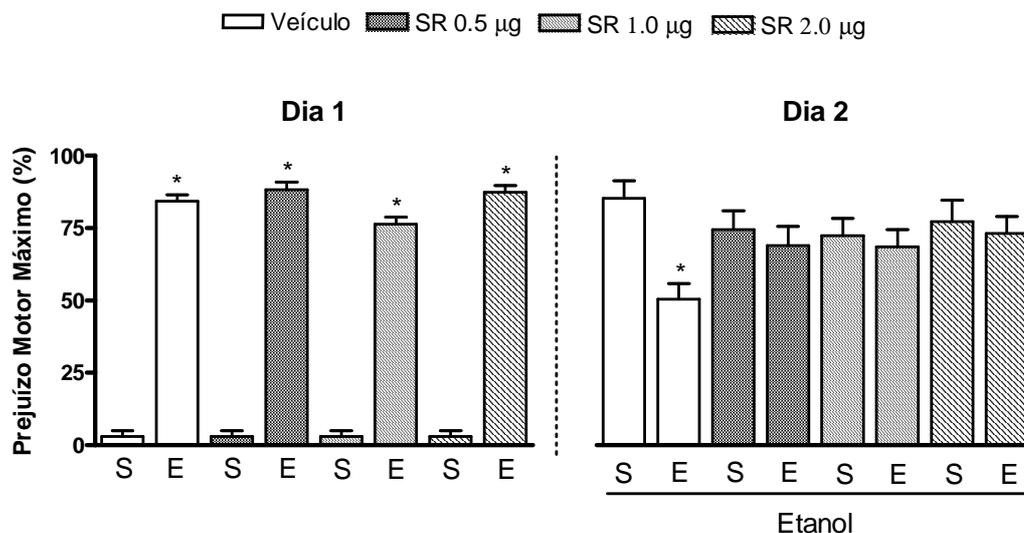


Figura 8: Efeito da administração i.c.v. de SR141716 na tolerância rápida. No dia 1, o tratamento com 2,7 g/Kg de etanol (E) promoveu um elevado prejuízo motor nos animais em relação ao grupo tratado com salina (S). No segundo dia, os animais pré-tratados com veículo apresentaram prejuízo reduzido quando tratados com etanol pela segunda vez, evidenciando a tolerância rápida. O pré-tratamento com o antagonista CB1 nas 3 doses administradas (0,5 µg, 1 µg e 2 µg) bloqueou o desenvolvimento de tolerância sendo evidenciado elevado prejuízo motor no segundo dia, mesmo nos animais tratados com etanol pela segunda vez. (*) $p < 0.05$ em comparação ao respectivo controle. ANOVA para medidas repetidas com fator tempo (dia 1 e dia 2) como medida repetida, seguida de teste de LSD. Dados expressos como média \pm EPM.

4.3. Efeito da administração do agonista canabinóide (WIN 55,212-2) sobre o efeito do antagonista CB1 na tolerância rápida ao etanol.

Observa-se na figura 9 que no dia 1, apenas os animais tratados com etanol apresentaram prejuízo motor, sendo o que grupo tratado com etanol e veículo no primeiro dia apresentou prejuízo motor diminuído no dia 2. O tratamento com 1 µg de SR141716 no dia 1 bloqueou o desenvolvimento de tolerância, tendo seu efeito revertido por uma dose de agonista (1 µg) que não apresentou efeito *per se* sobre a tolerância. A ANOVA sugere que o agonista canabinóide WIN55,212-2 reverteu o efeito do antagonista SR141716 pela

ausência de interação entre os três tratamentos [F_(1, 77) = 0,15; p = 0,70], com doses que não interferem com o efeito do etanol sobre o prejuízo motor [F_(1, 77) = 0,28; p = 0,60].

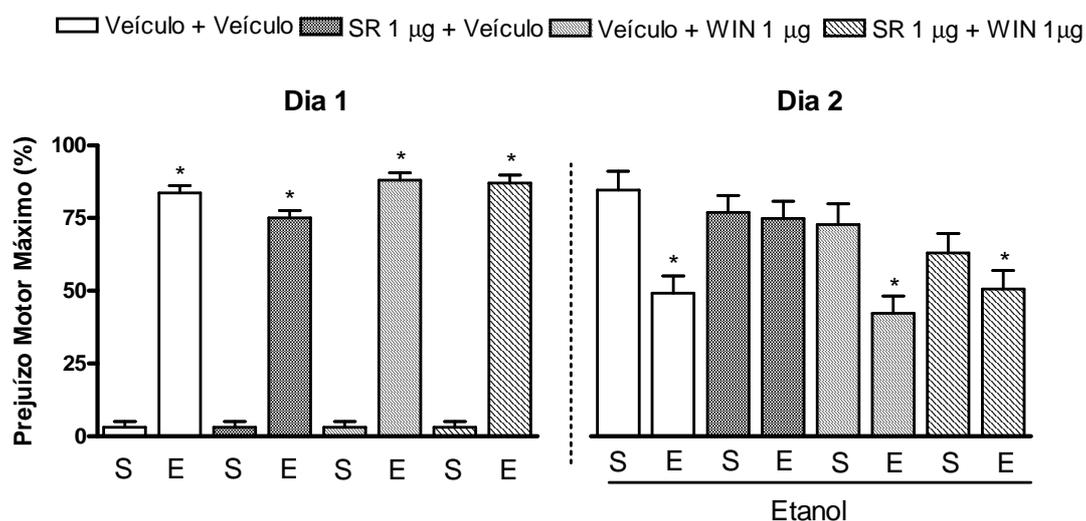


Figura 9: Efeito da administração i.c.v. de SR141716 e WIN55,212-2 na tolerância rápida. No dia 1, apenas o tratamento com 2,7 g/Kg de etanol (E) promoveu prejuízo motor. No segundo dia, os animais tratados com veículo (i.c.v.) apresentaram prejuízo reduzido quando tratados com etanol pela segunda vez, evidenciando a tolerância rápida. O tratamento com o antagonista CB1 (1 µg) bloqueou o desenvolvimento de tolerância sendo evidenciado elevado prejuízo motor no segundo dia. A administração imediata de uma dose de agonista canabinóide WIN55,212 (1 µg) que não teve efeito *per se* reverteu o bloqueio promovido pelo SR. (*) p < 0.05 em comparação ao respectivo controle. ANOVA seguida de teste LSD.

4.4. Tolerância aguda para diferentes doses de etanol.

Nos primeiros experimentos de tolerância aguda, após a administração sistêmica de cada uma das 3 doses de etanol, verificaram-se picos de concentração plasmática de álcool nos 15 minutos iniciais após a injeção intraperitoneal da droga, observando concentrações sanguíneas constantes ao longo dos 75 minutos de experimentos (figura 10A). Em paralelo, análises de prejuízo motor percentual no plano inclinado mostraram que o prejuízo motor promovido pelo álcool é máximo no primeiro momento do teste aos 15

minutos, diminuindo significativamente ao longo do tempo com repetidas exposições ao modelo (figura 10B). Análises de área sobre a curva (figura 10, C e D) revelam que concentrações plasmáticas [$F_{(2, 21)} = 64,33, p < 0,01$, ANOVA de 1 via] e prejuízo motor ao longo do tempo [$F_{(2, 21)} = 42,96, p < 0,01$, ANOVA de 1 via] foram diretamente relacionados à dose administrada.

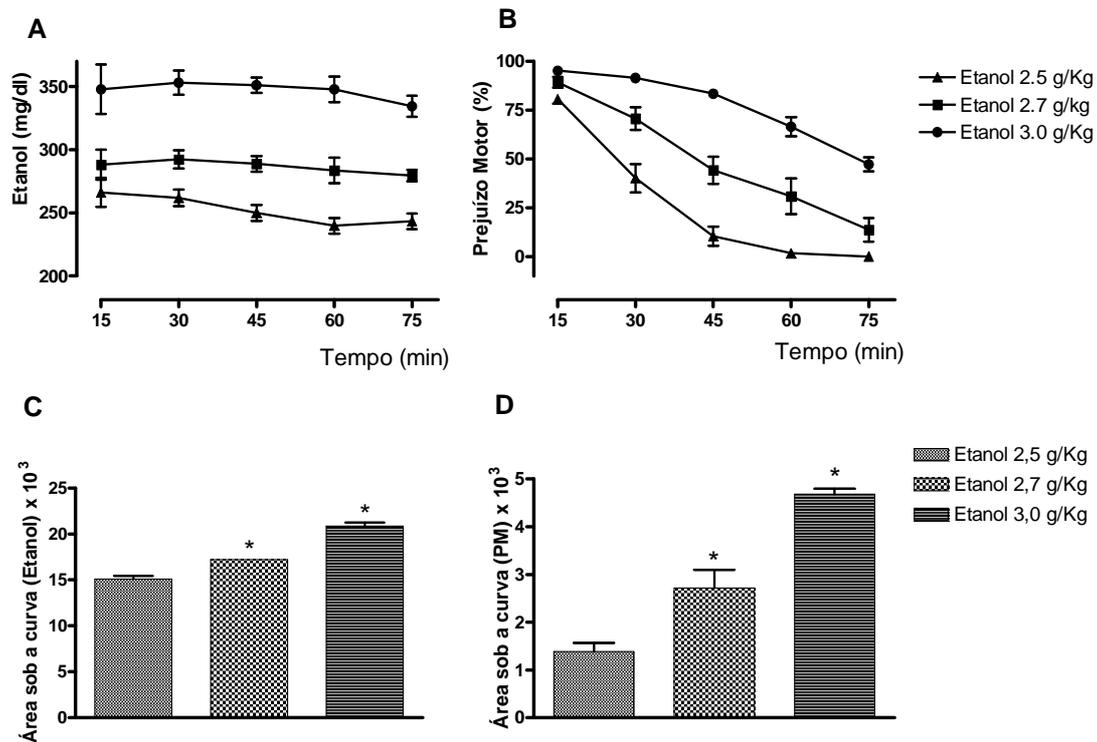


Figura 10: Efeito da administração de diferentes doses de etanol na tolerância aguda. **A)** Concentrações plasmáticas de etanol ao longo do tempo após administração i.p. de uma das 3 doses (2,5; 2,7 ou 3,0 g/Kg). **B)** Análise temporal do prejuízo motor promovido pela administração de cada dose de administrada. **C e D,** áreas sob as curvas da concentração alcoólica sanguínea e prejuízo motor, respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. (*) = $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. ANOVA de 1 via, seguida de teste LSD.

4.5. Efeito da administração i.c.v. de SR141716 na tolerância aguda ao etanol.

Na figura 11 encontra-se ilustrado o efeito da administração intracerebroventricular do antagonista canabinóide SR141716. A ANOVA da área sob a curva [$F_{(3, 33)} = 0,01$, $p = 0,96$] sugere que a microinjeção i.c.v. do antagonista CB1 não interferiu com o prejuízo motor promovido pelo etanol ao longo do experimento (figura 11D). De maneira inesperada, porém, esse tratamento promoveu uma redução significativa nas concentrações sanguíneas de etanol [$F_{(3, 33)} = 4,25$, $p = 0,01$] após microinjeções das duas maiores doses (2 e 4 μg) (figura 11, A e C).

4.6. Influência do agonista canabinóide (WIN 55,212-2) na redução das concentrações sanguíneas de etanol causada pelo SR141716.

Na figura 12, observa-se que a microinjeção de 1 μg do agonista canabinóide WIN55,212-2 *per se* não interferiu com o prejuízo motor [$F_{(1, 29)} = 0,23$, $p = 0,63$] nem com as concentrações plasmáticas de etanol [$F_{(1, 29)} = 0,68$, $p = 0,41$] analisando-se as áreas sob as curvas pela ANOVA de 1 via. No entanto, o agonista CB1 interagiu de maneira significativa com o tratamento do antagonista nas concentrações plasmáticas [$F_{(1, 29)} = 5,67$, $p = 0,02$] sugerindo uma inversão do efeito do antagonista sem interferir com o prejuízo motor [$F_{(1, 29)} = 0,15$, $p = 0,71$].

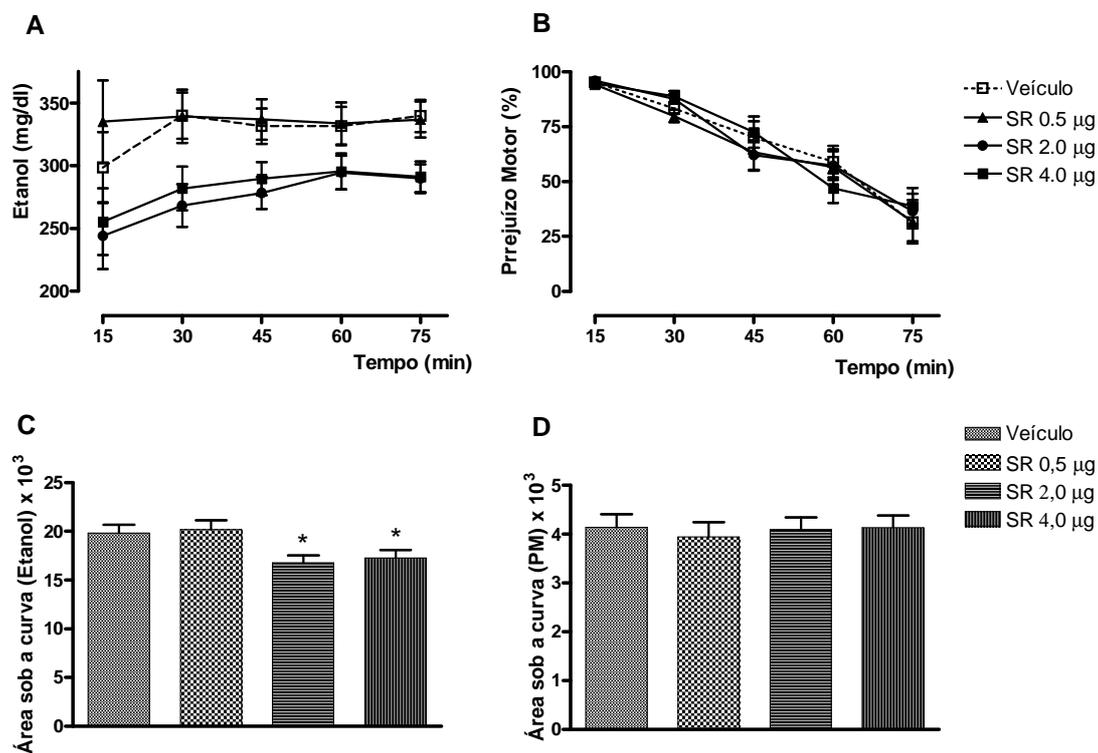


Figura 11: Efeito da administração i.c.v. de SR141716 na tolerância aguda ao etanol. **A)** Concentrações plasmáticas de etanol ao longo do tempo após administração i.p. de 3,0 g/Kg. **B)** Análise temporal do prejuízo motor promovido pela administração de etanol. **C e D,** áreas sob as curvas da concentração alcoólica sanguínea e prejuízo motor, respectivamente. Dados expressos como média ± EPM. (*) = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. ANOVA de 1 via, seguida de teste LSD.

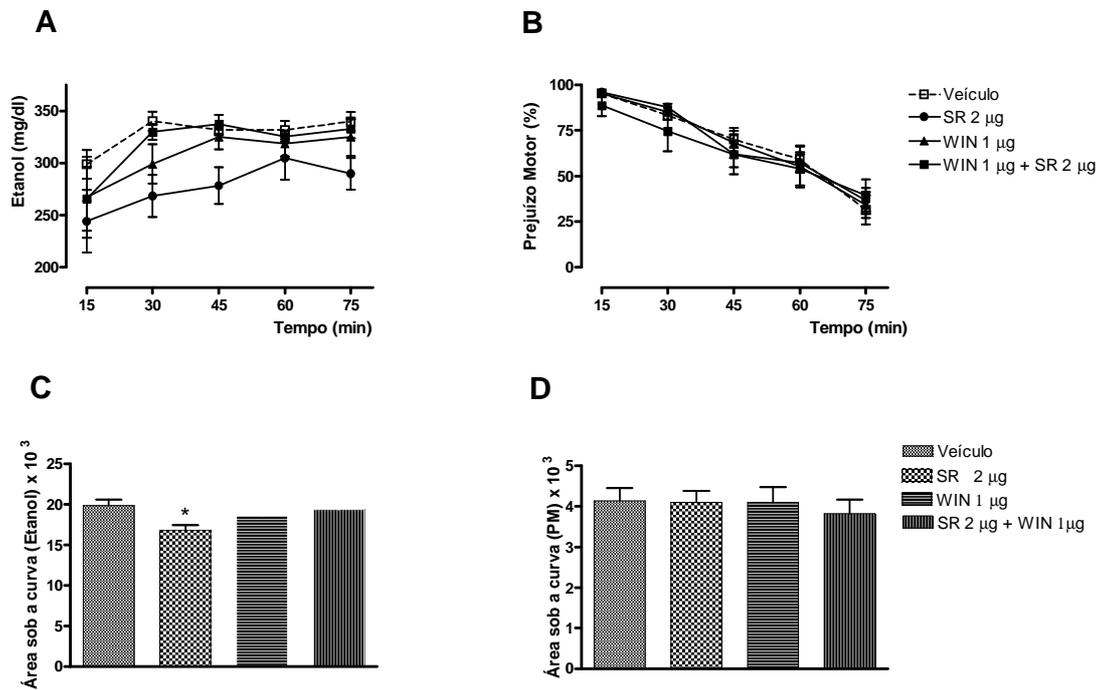


Figura 12: Efeito da administração i.c.v. de SR141716 e WIN55,212-2 na tolerância aguda. **A)** Concentrações plasmáticas de etanol ao longo do tempo após administração i.p. de 3,0 g/Kg. **B)** Análise temporal do prejuízo motor promovido pela administração de etanol. **C e D,** áreas sob as curvas da concentração alcoólica sanguínea e prejuízo motor, respectivamente. Dados expressos como média \pm EPM. (*) = $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. ANOVA de 1 via, seguida de teste LSD.

4.7. Efeitos da administração de SR141716 na concentração de etanol na urina.

A figura 13 ilustra o efeito da administração central do antagonista CB1 na eliminação de etanol pela urina. A ANOVA de 1 via demonstrou que o tratamento i.c.v com SR141716 não interferiu com a estimativa do volume urinário [$F_{(2, 20)} = 0,33, p = 0,72$] (figura 13A), porém interferiu significativamente nas concentrações de etanol eliminadas na urina [$F_{(2, 20)} = 4,68, p = 0,02$], sendo observada uma redução nas concentrações de etanol com a administração i.c.v. da maior dose do antagonista CB1 (figura 13B). Este experimento sugere que as concentrações de etanol no sangue e na urina, após o tratamento i.c.v. com o antagonista CB1 (ou veículo), são proporcionais.

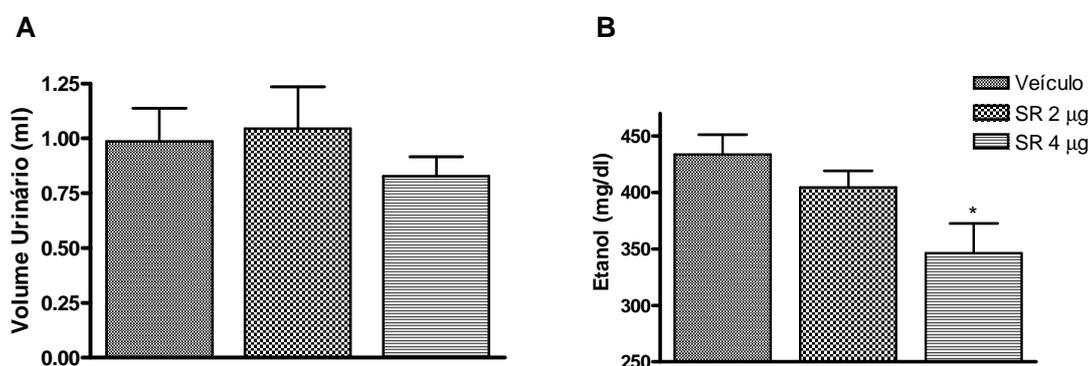


Figura 13: Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista CB1 na concentração de etanol na urina coletada durante 75 minutos após a injeção de etanol. Observa-se que a administração do antagonista CB1 não interferiu com o volume urinário (A), porém reduziu significativamente, na maior dose administrada, as concentrações de etanol na urina (B). Dados expressos como média \pm EPM. (*) $p < 0,05$, ANOVA de 1 via seguida de teste LSD.

4.8. Efeitos da administração i.c.v. de SR141716 nas alterações cardiovasculares promovidas pelo Etanol.

Ainda considerando o efeito da administração aguda de SR141716 (i.c.v.) em reduzir as concentrações de etanol no sangue, o próximo experimento foi realizado para verificar se alterações na pressão arterial ou na frequência cardíaca promovidas pela droga poderiam, explicar uma maior metabolização. Em animais anestesiados e com registros de pressão arterial e frequência cardíaca estáveis, a ANOVA para medidas repetidas revelou que a administração sistêmica de etanol (3 g/Kg) reduziu significativamente a pressão arterial [$F_{(1, 15)} = 70,12$, $p < 0,01$], sem promover alterações na frequência cardíaca. O tratamento com SR141716 *per se* não interferiu na PA [$F_{(1, 15)} = 2,50$, $p = 0,13$] nem na FC [$F_{(1, 15)} = 1,68$, $p = 0,21$]. No entanto, a administração i.c.v de SR141716 elevou significativamente a FC no grupo tratado com etanol [$F_{(1, 15)} = 4,81$, $p = 0,04$] sem alterar a PA [$F_{(1, 15)} = 1,71$, $p = 0,21$]. Observa-se na figura 14 que o tratamento com etanol na dose de 3 g/Kg promove elevada queda de pressão arterial sem alterar a frequência cardíaca de ratos anestesiados, observa-se também que o antagonista CB1 não promoveu qualquer alteração nem na PA nem na FC, porém após tratamento com o etanol promoveu uma elevação significativa de frequência cardíaca acompanhada de alterações de pressão arterial que apesar de não diferir do grupo tratado com etanol e veículo também não diferiu dos grupos tratados com salina, evidenciada pelo teste LSD.

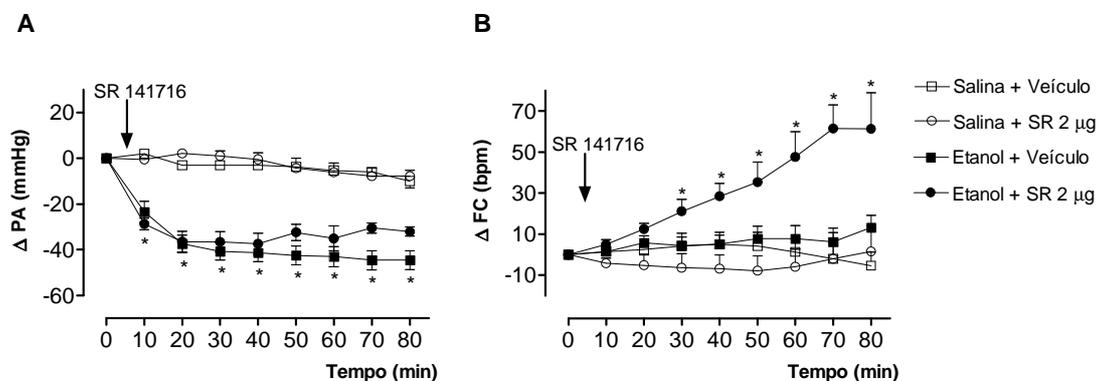


Figura 14: Efeito da administração intracerebroventricular do antagonista CB1 nas alterações cardiovasculares promovidas pela administração sistêmica de etanol. **(A)** Alterações na pressão arterial expressas como diferenças de pressão em relação aos valores basais (PA, em mmHg). (*) $p < 0,05$ (grupo tratado com etanol + veículo em relação aos grupos tratados com salina). **(B)** Alterações na frequência cardíaca expressas como diferenças de frequência em relação aos valores basais (ΔFC , em bpm). (*) $p < 0,05$, em relação à medida inicial dentro do mesmo grupo. Dados expressos como média \pm EPM. Análises estatísticas com ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste LSD.

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm verificado efeito do antagonista CB1 SR141716 na redução de propriedades reforçadoras do etanol, diminuindo o consumo (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Hungund *et al.*, 2003) e a preferência ao álcool (Hungund *et al.*, 2003; Poncelet *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003), entretanto, este é o primeiro estudo mostrando os efeitos do antagonista CB1 no desenvolvimento de tolerância ao etanol em ratos. Esses resultados divergem parcialmente de resultados prévios em que o antagonista CB1 não afetou o desenvolvimento de tolerância rápida em camundongos testados no modelo do “*rotarod*” sobre o desenvolvimento de tolerância rápida (Da Silva *et al* 2001). No entanto os diferentes resultados obtidos podem ser explicados pelas diferenças metodológicas entre os dois estudos, tais como espécie, modelo utilizado e doses empregadas do antagonista canabinoide.

Confirmando dados anteriores do laboratório (Wazlawik & Morato, 2002; 2003, Varaschin *et al.*, 2005), os resultados deste estudo mostraram que os animais tratados por via sistêmica com 2,7 g/Kg de etanol apresentaram um prejuízo motor elevado em comparação com os animais tratados com salina. Este prejuízo diminuiu significativamente ao longo do tempo, sendo maior na primeira exposição ao teste (30 minutos após a injeção de etanol). Observou-se também, no segundo dia, uma redução significativa do prejuízo motor nos animais que receberam etanol na mesma dose (2,7 g/Kg) pela segunda vez, evidenciando o desenvolvimento de tolerância rápida, efeito não observado nos animais controles. Como as diferenças mais significativas entre os dois grupos ocorreram no primeiro momento do teste (30 minutos), no qual o prejuízo motor foi mais evidente, o prejuízo motor nesse intervalo em cada dia foi usado como medida comportamental válida

para estudar a tolerância rápida. Este tipo de interpretação está condizente com outros trabalhos que utilizaram o prejuízo motor máximo nos dois dias do teste para avaliar a tolerância rápida ao efeito de incoordenação motora promovida pela administração sistêmica de etanol (Khanna *et al.*, 1996; Wazlawik & Morato, 2002; 2003, Varaschin *et al.*, 2005).

Com respeito aos efeitos do bloqueio do receptor CB1 na tolerância rápida este estudo mostrou que a administração sistêmica do antagonista CB1 SR141716 bloqueou, de maneira dependente da dose, o desenvolvimento de tolerância rápida. Além da localização predominante no SNC, sabe-se que existem receptores CB1 periféricos que poderiam justificar alguns dos efeitos sistêmicos desse antagonista (Gómez *et al.*, 2002). No entanto, o bloqueio da tolerância rápida obtido com a administração i.c.v. do antagonista canabinóide SR141716 reforça o envolvimento de receptores canabinoides centrais nesse fenômeno. Além disso, o agonista canabinóide WIN55,212-2 microinjetado em dose que não apresenta efeitos *per se* por via i.c.v., subseqüentemente ao SR141716, impediu o bloqueio da tolerância rápida pelo antagonista canabinóide CB1. Assim, o bloqueio da tolerância rápida pelo antagonista canabinóide parece ser específico e não uma consequência da influência de endocanabinóides em outros alvos moleculares (Di Marzo *et al.*, 2002), como o receptor “CB3”, sugerido por alguns pesquisadores como possível subtipo de receptor canabinóide (Piomelli, 2003; Freund *et al.*, 2003). Já que existe uma predominância de receptores CB1 no sistema nervoso central, o uso do agonista WIN55,212-2 pela via i.c.v. reforçou o envolvimento de receptores CB1 no bloqueio da tolerância rápida promovido pelo SR141716. Em conjunto esses dados sugerem que o sistema endocanabinóide participa no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol por mecanismos envolvendo os receptores CB1 centrais.

Tem sido sugerido que o desenvolvimento de tolerância rápida é um fenômeno dependente do aprendizado (Bitran & Kalant, 1991; Khanna *et al.*, 1996), uma vez que a exposição do animal ao teste depois (mas não antes) da injeção sistêmica de etanol é necessária para o desenvolvimento da tolerância rápida (Khanna *et al.*, 1996). Além disso, drogas que prejudicam processos de aprendizado, como antagonistas do receptor NMDA (Khanna *et al.*, 1994; Morato & Khanna, 1996), e inibidores da síntese de óxido nítrico (Wazlawik & Morato, 2002; 2003), bloquearam a aquisição de tolerância, sugerindo o envolvimento de fatores ligados ao aprendizado e de processos de plasticidade sináptica em seu desenvolvimento. No entanto, os resultados do presente estudo não parecem ser decorrentes de um prejuízo no aprendizado causado pelo antagonista canabinóide nas doses empregadas já que há evidências sugerindo uma ação facilitadora do aprendizado e memória pelo bloqueio CB1 (Wolff & Leander, 2003; Takahashi *et al.*, 2005).

Apesar de diversos efeitos similares entre etanol e canabinóides tais como hipotermia, incoordenação motora, analgesia e prejuízos de memória (Hollister & Gillespie, 1970; Heishman *et al.*, 1997) serem conhecidos há bastante tempo, foi após a descoberta (Devane *et al.*, 1988) e clonagem (Matsuda *et al.*, 1990) dos receptores canabinóides, a identificação de ligantes endógenos (Devane *et al.*, 1992) e a caracterização de suas vias biossintéticas (Di Marzo *et al.*, 1994; Di Marzo *et al.*, 1996; Bisogno *et al.*, 1997; Stella *et al.*, 1997) que diversos estudos verificaram possíveis ações do etanol nesse sistema de neurotransmissão, sugerindo-se que alguns efeitos do álcool poderiam ser mediados por receptores canabinóides centrais (Hungund & Basavarajappa, 2000; Basavarajappa & Hungund, 2002; Basavarajappa & Hungund, 2005). Os resultados comportamentais apresentados no presente estudo estão condizentes com diversos trabalhos que mostraram desenvolvimento de tolerância crônica cruzada entre etanol e Δ^9 -THC (Newman *et al.*,

1972; Macavoy & Marks, 1975; Sprague & Craigmill, 1976; Siemens & Doyle, 1979; Marks & MacAvoy, 1989) e com um trabalho recente do grupo que estendeu o desenvolvimento de tolerância cruzada entre álcool e Δ^9 -THC também para a tolerância rápida à incoordenação motora causada pelo álcool (Da Silva *et al.*, 2001). Considerando que ocorre tolerância cruzada entre o endocanabinóide anandamida e o Δ^9 -THC (Pertwee *et al.*, 1993; Frider, 1995), e que o etanol leva ao aumento de anandamida nas sinapses (Basavarajappa & Hungund, 1999), pode-se sugerir que o desenvolvimento de tolerância cruzada entre etanol e Δ^9 -THC seja em parte devido à potenciação da neurotransmissão endocanabinóide promovida pelo álcool (Hungund & Basavarajappa, 2000; Basavarajappa & Hungund, 2002; Basavarajappa & Hungund, 2005).

Conforme mencionado na introdução deste trabalho, as estruturas cerebrais envolvidas no sistema motor (substância nigra pars compacta e pars reticulada, caudado-putâmem, globo pálido, córtex motor, córtex cerebelar) contém alta densidade de receptores canabinóides CB1 (Howlett *et al.*, 1990; Breivogel & Childers, 1998). Diversos estudos têm sugerido uma regulação do sistema motor pelo sistema canabinóide endógeno modulando tanto sinapses excitatórias glutamatérgicas quanto inibitórias GABAérgicas (Rodrigues de Fonseca *et al.*, 1998; Giuffrida *et al.*, 1999; Giuffrida *et al.*, 2000; Julian *et al.*, 2003; van der Stelt & Di Marzo, 2003). Tanto o etanol como os canabinóides prejudicam o desempenho motor, e, como já mencionado, a administração crônica de álcool promove uma potenciação da neurotransmissão endocanabinóide. Por isso, alguns autores têm sugerido que adaptações no sistema de neurotransmissão endocanabinóide podem ser importantes para o desenvolvimento de tolerância ao álcool (Hungund & Basavarajappa, 2000; Basavarajappa & Hungund, 2002; Basavarajappa & Hungund, 2005). Portanto, é

concebível supor que o bloqueio da tolerância rápida a incoordenação motora causada pelo etanol seja decorrente de uma ação do SR141716 no sistema motor.

Do ponto de vista molecular há evidências de que a tolerância ao etanol envolve diversos processos neuroadaptativos em diversos sistemas de neurotransmissão. Essas neuroadaptações podem ser rápidas ou lentas, envolvendo desde eventos de fosforilação de subunidades de receptores até diminuição de expressão de determinados subtipos dessas subunidades (Loh & Ball, 2000; Ron, 2004). Dentre os sistemas de neurotransmissão mais envolvidos nas neuroadaptações promovidas pela administração de etanol, destacam-se o glutamatérgico, principalmente através do receptor NMDA, e o GABAérgico, principalmente com o receptor GABA_A (Chandler *et al.*, 1998).

Sabe-se que alterações moleculares rápidas (fosforilações) ou lentas (alterações de expressões de subunidades) nos receptores NMDA ou GABA_A são as mais envolvidas com o desenvolvimento de tolerância e sensibilidade aos efeitos depressores do etanol, uma vez que esses são os dois principais sistemas de neurotransmissão envolvidos nos efeitos depressores do etanol. Alterações rápidas como fosforilações podem promover sensibilidade diminuída ao longo de uma única exposição ao etanol, ocorrendo diminuição dos efeitos inibitórios do álcool sobre os receptores NMDA, ou ainda sensibilidade aumentada dos receptores GABA_A após uma única administração (Grobin *et al.*, 1998; Loh & Ball, 2000; Krystal *et al.*, 2003; Ron, 2004).

Adicionalmente, uma vez que o sistema de neurotransmissão endocanabinóide regula a liberação de diversos neurotransmissores e que pode interferir com cascatas de transdução intracelular, poderia direta ou indiretamente interferir em eventos moleculares importantes no desenvolvimento de tolerância rápida. Por exemplo, os antagonistas endocanabinóides inibem a liberação de dopamina no núcleo accumbens (Hungund *et al.*,

2003; Perra *et al.*, 2005). Sabe-se que a dopamina, ao atuar em receptores dopaminérgicos, promove aumento da expressão da proteína DARPP-32, a qual reduz a sensibilidade de receptores NMDA aos efeitos depressores do etanol (Maldve *et al.*, 2002). Como o sistema endocabinóide pode modular neurônios dopaminérgicos, além dos glutamatérgicos e GABAérgicos, em estruturas relacionadas ao controle motor, é possível que o uso de antagonistas CB1 interfira em processos neuroadaptativos envolvidos no desenvolvimento de tolerância ao etanol através do sistema dopaminérgico.

Outra possibilidade interessante para explicar de modo especulativo a participação do receptor CB1 na tolerância rápida ao etanol é o fato de diversos subtipos de receptores (δ opióide, CB1, D2 da dopamina) acoplados a proteína Gi/0 apresentarem a propriedade de estimular (através do dímero $\beta\gamma$ da proteína G dissociada) as isoformas de adenilato ciclase subtipos II e IV, promovendo inicialmente aumento das concentrações de AMPc que pode ativar proteínas cinases, e, após 5 horas, aumentar a expressão de diversos genes, pela ativação de fatores de transcrição, especialmente CREB (Yao *et al.*, 2003). Deste modo, é possível que a ativação de receptores CB1 module mecanismos de transdução de outros receptores, através da ativação de proteínas cinases resultante da ativação de isoformas da adenilato ciclase via dímero $\beta\gamma$ da proteína G dissociada, ou através da alteração da expressão de subunidades de receptores envolvidos na sensibilidade aos efeitos depressores do etanol.

Como já relatado previamente, a tolerância rápida tem sido proposta como um modelo para prever aspectos relevantes da tolerância crônica ao etanol (Khanna *et al.*, 1991; 1992; 1996). Assim, com base em nosso estudo e em evidências da literatura é possível sugerir um papel do sistema endocanabinóide e dos receptores CB1 centrais no desenvolvimento da tolerância crônica ao etanol.

Um segundo enfoque do presente estudo foi avaliar o efeito do bloqueio CB1 central na tolerância aguda ao etanol. Observou-se que, paralelamente ao retorno à coordenação motora normal dos animais ao longo dos 75 min de experimento, a concentração alcoólica sangüínea permaneceu elevada, caracterizando o fenômeno de tolerância aguda (Kalant *et al.*, 1971; LeBlanc *et al.*, 1975; Khanna *et al.*, 2002; Radlow, 1994). Esta redução do prejuízo motor com concentrações circulantes de álcool inalteradas ao longo do tempo foi observada com as três doses de etanol administradas sugerindo que a tolerância aguda parece ser um fenômeno tempo-dependente e “treino-dependente”, porém não dose-dependente, conforme já havia sido sugerido por trabalhos anteriores (Lê & Kalant, 1992; Radlow, 1994; Khanna *et al.*, 2002).

A administração i.c.v. do antagonista SR141716 não interferiu com o prejuízo motor promovido pelo etanol em comparação com o grupo controle, porém as maiores doses causaram redução estatisticamente significante nas concentrações plasmáticas de etanol. Assim, esses resultados sugerem que o bloqueio do receptor CB1 não interfere na tolerância aguda ao etanol. No entanto, algumas diferenças em relação a estudos da literatura serão discutidas a seguir.

Há evidências de que diferentes classes de drogas bloqueiam a tolerância aguda ao etanol pelo fato de prejudicarem a recuperação motora dos animais sem, no entanto, afetarem as concentrações alcoólicas sangüíneas (Quintanilla & Tampier, 2000; Khanna *et al.*, 2002). Mesmo nos estudos concluindo que uma droga não afetou (Khanna *et al.*, 1992), ou que estimulou a tolerância aguda (Khanna *et al.*, 2002) não houve diferenças significantes nos níveis sangüíneos de etanol entre os grupos experimentais e controle. Embora o sangue periférico tenha sido usado para avaliar a alcoolemia no presente estudo, vários trabalhos mostraram que não há diferenças entre os níveis de álcool no sangue e no

cérebro medidos ao mesmo tempo após a administração i.p. de etanol (Gostomzyk et al., 1969; LeBlanc et al, 1975; Tabakoff et al., 1986) especialmente em intervalos maiores que 10 min (Sunahara *et al.*, 1978). Além disso, no presente estudo observa-se que o prejuízo motor varia de acordo com a concentração sanguínea de álcool (ver figura 10). Assim, uma vez que na presença do bloqueio CB1 a alcoolemia estava baixa, mas a performance motora dos animais estava inalterada, é possível sugerir que estes se encontravam mais sensíveis ao efeito depressor do etanol. Esse resultado está consistente com trabalhos que verificaram maior sensibilidade para os efeitos hipotérmicos, locomotores e hipno-sedativos do etanol em camundongos nocautes para o receptor CB1 em comparação com os selvagens (Naasila *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos têm mostrado que a sensibilidade aos efeitos depressores do álcool está inversamente relacionada ao consumo (Harris *et al.*, 1995; Hodges *et al.*, 1999; Olive *et al.*, 2000; Bowers & Wehner, 2001), sendo que linhagens menos sensíveis aos efeitos depressores do etanol tendem a consumir mais álcool (Kurtz *et al.*, 1996; Tampier *et al.*, 2000). Nesse contexto, poderia ser especulado que a redução do consumo de etanol promovida pela administração do antagonista CB1 relatada em outros estudos (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Gallate & McGregor, 1999; González *et al.*, 2004) também poderia decorrer da maior sensibilidade ao efeito depressor do álcool causada pelo antagonista, e não apenas à redução das propriedades reforçadoras do etanol sugerido pelos autores (Colombo *et al.*, 1998; Hungund *et al.*, 2003). Além disso, é possível sugerir que as alterações observadas após a injeção i.c.v. de antagonista CB1 no modelo da tolerância aguda relatadas aqui tenham ocorrido de modo semelhante no primeiro dia de teste no modelo de tolerância rápida, o que explicaria em parte o bloqueio deste último tipo de tolerância pelo antagonista CB1.

A redução da alcoolemia pelo bloqueio CB1 via i.c.v. está de acordo com resultados empregando uma dose alta (10 mg/Kg) de SR141716 por via i.p. em ratos Wistar tratados com etanol. No entanto, discorda de estudos nos quais essa droga não alterou os níveis alcoólicos sanguíneos em “ethanol-preferring sP rats” (Colombo *et al.*, 1998), bem como discorda de estudos com camundongos nocautes para receptor CB1, nos quais houve maior alcoolemia após a administração de uma dose elevada de álcool (5 g/Kg) em comparação com os selvagens (Lallemant & De Witte, 2005). Entretanto, as diferenças existentes entre os resultados da literatura e os deste estudo podem ser devidas aos diferentes protocolos experimentais, doses, espécies e linhagens empregados. Reforçando a participação de receptores CB1 na redução da alcoolemia pelo SR141716, a administração i.c.v. do agonista canabinoide WIN55,212-2 subsequentemente ao antagonista impediu esse efeito, sem interferir na performance motora dos animais. É pouco provável que os efeitos aqui descritos sejam decorrentes de uma ação do antagonista em receptores CB1 periféricos porque as doses empregadas (0,5 – 4 µg) não são efetivas quando administradas sistemicamente (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Em conjunto com os trabalhos citados acima, nossos resultados sugerem uma participação importante de receptores CB1 centrais na regulação das concentrações plasmáticas do etanol. Este é o primeiro estudo a observar alterações na alcoolemia após microinjeções centrais do antagonista CB1.

A redução da alcoolemia pela administração central de SR141716 poderia ser resultante do efeito desse antagonista em diferentes etapas farmacocinéticas do etanol. Como a absorção do etanol ocorre após os minutos iniciais da administração i.p. dessa droga (Czaja & Kalant, 1961) e as administrações i.c.v. do SR141716 foram feitas 5 min após as administrações i.p. sugerimos que o efeito do antagonista na etapa de absorção deva ser de

menor importância. Por isso neste trabalho verificou-se se a administração i.c.v. do antagonista CB1 poderia aumentar a eliminação de etanol pela urina. Devido a razões metodológicas, apenas uma coleta urinária foi feita durante 75 min (tempo igual ao do experimento de tolerância aguda) após a injeção de etanol. O efeito diurético do etanol (Ragland, 1990; Rodrigo *et al.*, 1998) promovido pela inibição da secreção de vasopressina através do bloqueio de canais de cálcio nas terminações nervosas da neurohipófise (Wang *et al.*, 1991) ocorre apenas em doses moderadas (Pohorecky, 1985) sendo que doses mais elevadas podem apresentar o efeito oposto, justificando em parte a dificuldade na coleta de amostras de urina nesse estudo. As concentrações elevadas de etanol obtidas na urina foram consistentes com as concentrações teóricas devido ao pequeno volume urinário (em torno de 1 ml) comparado com o volume sanguíneo total (cerca de 70 ml) de um rato adulto, que resulta num percentual urinário abaixo de 5% do total de álcool absorvido. Outros autores obtiveram concentrações urinárias de etanol menores, com concentrações sanguíneas equivalentes às apresentadas aqui (Badger *et al.*, 2005), porém isso pode ser explicado porque usaram animais fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, e a dosagem de etanol feita na urina de 24 horas.

A administração central do antagonista CB1 não interferiu no volume urinário, mas como na alcoolemia, promoveu concentrações de álcool menores na urina. Embora existam evidências de que a anandamida diminua a taxa de filtração glomerular renal pela diminuição da pressão sanguínea de vasos locais mediada pelo receptor CB1 (Koura *et al.*, 2004), nenhum estudo demonstrou, até o momento, uma regulação da filtração glomerular por receptores canabinóides cerebrais. Nossos resultados contrariam a hipótese de que a menor alcoolemia apresentada pelos animais tratados com SR141716 seria devida à eliminação aumentada de etanol na urina. Concluiu-se apenas que as concentrações de

álcool na urina, nos grupos tratados ou não com antagonista CB1, correlacionam-se com os níveis sanguíneos de álcool.

A interferência direta do bloqueio CB1 central no metabolismo hepático do etanol não foi avaliada no presente estudo. No entanto, foi realizado um experimento adicional para verificar se a redução da alcoolemia promovida pela injeção i.c.v. do antagonista CB1 poderia ser decorrente de alterações cardiovasculares que pudessem sugerir aumento no débito cardíaco, o qual explicasse uma maior eliminação e/ou metabolização de álcool, na presença do SR141716. Em animais anestesiados, com registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) estáveis, a administração i.c.v. de SR141716 ou do veículo não alterou os valores basais de PA e FC ao longo de 80 minutos de experimento. O etanol causou uma redução significativa na PA dos animais tratados i.c.v com veículo (controles), a qual não foi compensada com uma elevação reflexa da FC. Estes resultados estão condizentes com outros estudos mostrando que a administração de etanol intravenosa ou diretamente no núcleo do trato solitário (NTS) inibe a resposta reflexa, possivelmente por um bloqueio de receptores NMDA do NTS (el-Mas & Abel-Rahman, 1992; el-Mas & Abel-Rahman, 1993). Com a administração de etanol, a PA média é reduzida provavelmente devido a vasodilatação dos vasos de resistência (Puddey *et al.*, 2001), porém a FC permanece inalterada possivelmente devido à inibição da resposta barorreflexa pelo etanol.

De modo diferente ao ocorrido com o grupo controle, a administração i.c.v. de SR141716 cinco minutos após a injeção de álcool causou uma queda de PA seguida do aumento significativo da FC. Alguns trabalhos têm mostrado que o sistema endocanabinoide e o receptor CB1 podem estar envolvidos na resposta barorreflexa através da ativação de receptores presentes em estruturas do tronco encefálico, principalmente o

NTS. Há evidências de que a administração de SR141716 no NTS aumenta a duração do barorreflexo (Rademacher *et al.*, 2003) e, ao contrário, a microinjeção de anandamida diminui a resposta barorreflexa (Seagard *et al.*, 2004; 2005). Diante de nossos resultados e das evidências da literatura é possível sugerir que o sistema canabinóide e o receptor CB1 centrais modulem, pelo menos em parte, os efeitos do etanol no sistema cardiovascular. Este é o primeiro estudo sugerindo um envolvimento do sistema endocanabinóide central nos efeitos do etanol sobre o sistema cardiovascular, possivelmente por ações envolvendo receptores CB1 do NTS (Rademacher *et al.*, 2003; Seagard *et al.*, 2004; 2005).

Esta abordagem, no entanto, não permitiu sugerir algum aumento no débito cardíaco que explicasse uma maior eliminação e/ou metabolização de álcool, na presença do SR141716. Entretanto alguns aspectos deste experimento merecem ser discutidos. Inicialmente é importante ressaltar que para a medida dos parâmetros cardiovasculares os animais encontravam-se anestesiados. Durante o procedimento experimental da tolerância aguda, no entanto, os animais ao serem manipulados para a medida comportamental e a punção da cauda, poderiam ter alterações mais significativas, tanto na PA quanto na FC, em decorrência de um estresse moderado. Sabendo que a taquicardia em resposta ao estresse também é inibida pelo etanol por um mecanismo regulado por receptores NMDA do NTS (Varga *et al.*, 1996) e que os endocanabinóides podem modular o sistema cardiovascular através de receptores CB1 dessa estrutura cerebral (Rademacher *et al.*, 2003; Seagard *et al.*, 2004; 2005), é possível que nos animais acordados as alterações cardiovasculares promovidas pela injeção i.c.v. do antagonista CB1 fossem mais pronunciadas. Porém, por inviabilidade técnica os parâmetros cardiovasculares não foram testados nos animais submetidos no plano inclinado.

Há evidências de que o sistema endocanabinóide tem um papel importante na regulação de comportamentos defensivos relacionados a situações estressantes (para revisão; Valverde, 2005; Witkin *et al.*, 2005; Wotjak, 2005; Viveros *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que aumentos da pressão arterial e da oxigenação tecidual hepática estão relacionados a aumentos da metabolização de etanol, fenômeno conhecido como hipermetabolismo hepático. Desta forma seria possível especular se as alterações cardiovasculares promovidas pela administração central do antagonista CB1 poderiam facilitar e/ou acelerar a degradação do etanol pelo fígado por aumentar o fluxo sanguíneo e a oxigenação tecidual. O hipermetabolismo hepático de etanol é um fenômeno adaptativo que ocorre geralmente após exposições crônicas ao álcool (Mendelson & Mello, 1966; Videla & Israel, 1970), mas também pode ocorrer agudamente após tratamento com doses elevadas dessa droga (Yuki & Thurman, 1980; Thurman *et al.*, 1982). Entre os fatores envolvidos no hipermetabolismo hepático o principal é o aumento da utilização de oxigênio pelos hepatócitos. Sabe-se que níveis plasmáticos aumentados de epinefrina, norepinefrina, corticosterona e glucagon correlacionam-se de maneira positiva com o aumento do metabolismo (Yuki & Thurman, 1980; Yuki *et al.*, 1980). O aumento da oxigenação hepática e respiração mitocondrial elevam as concentrações da forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), cofator importante e limitante da degradação enzimática do álcool pela álcool-dehidrogenase (ADH). Além disso, o fluxo aumentado de oxigênio pode favorecer a metabolização do álcool por outras vias como a do sistema de oxidação microsômico P-450, bem como a via da catalase (Thurman & Mckenna, 1975; Thurman *et al.*, 1976; Thurman & Scholz, 1977).

Dessa forma, se a hipótese de que na situação experimental da avaliação da tolerância aguda os animais encontravam-se mais estressados, e face aos trabalhos da

literatura sobre o hipermetabolismo hepático, seria possível especular se a elevação da frequência cardíaca por administração i.c.v. de SR141716 após o etanol poderia favorecer o metabolismo do etanol por aumentar a oxigenação hepática.

Ainda com relação ao estresse, já foi demonstrado que eventos estressantes repetidos ou intensos podem alterar as concentrações plasmáticas de etanol, provavelmente por reduzir a absorção da droga (Wallgren & Tirri, 1963). No presente estudo houve maiores variações nas concentrações plasmáticas observadas no período inicial (15 minutos) nos grupos tratados apenas com etanol e, principalmente, nos experimentos com administrações centrais. Mas como já mencionado, o efeito da injeção i.c.v. de SR 141716 na absorção não foi avaliado.

Para concluir, é importante ressaltar que o etanol por ser uma molécula simples que apresenta vários alvos moleculares no sistema nervoso central, pode afetar praticamente todos os sistemas de neurotransmissão e promover uma grande quantidade de efeitos mediados centralmente. No presente estudo, verificamos a manipulação de apenas um desses sistemas, o endocanabinóide, porém indiretamente pode-se estar interferindo na regulação de outros, principalmente pelo fato de os endocanabinóides atuarem como neuromoduladores inibitórios da liberação de praticamente todos os neurotransmissores, sendo conhecidos como mensageiros retrógrados (Di Marzo *et al.*, 1998; Wilson & Nicoll, 2002; Piomelli, 2003).

Há evidências de que diversos sistemas de neurotransmissão podem atuar em conjunto modulando efeitos do etanol e assim, têm sido sugeridos tratamentos combinados de drogas que atuam em diferentes sistemas na redução do consumo de álcool (Myers & Lankford, 1996; Rezvani *et al.*, 2000; Heyser *et al.*, 2003; Stromberg, 2004; Gallate *et al.*, 2004), como o uso de baixas doses dos antagonistas opióide naltrexona e canabinóide

SR141716 (Gallate *et al.*, 2004; Manzanares *et al.*, 2005). Sabe-se que existem diversas interações nesses dois sistemas nos efeitos moleculares e comportamentais promovidos pelo álcool (para revisão ver Manzanares *et al.*, 2005). Em estudos do nosso laboratório verificou-se que o antagonista opióide naltrexona bloqueia o desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora promovida por etanol (Varaschin *et al.*, 2005), estendendo o efeito de bloqueio da tolerância aguda observado por Quintanilla *et al.* (2000). No presente trabalho verificamos que administração central do antagonista CB1 bloqueou a tolerância rápida, não interferiu no desenvolvimento da tolerância aguda, mas parece ter aumentado a sensibilidade a incoordenação motora induzida por etanol após uma única exposição.

Em conjunto, os resultados desse estudo mostram a complexidade de efeitos do etanol no sistema nervoso central, em particular no sistema endocanabinóide, sugerindo que o mesmo participa em processos adaptativos centrais, bem como interfere nas concentrações plasmáticas de etanol e nos efeitos cardiovasculares mediados centralmente.

6. CONCLUSÕES

- As administrações sistêmica e intracerebroventricular do antagonista canabinóide CB1 SR141716 bloquearam a tolerância rápida a incoordenação motora induzida por etanol, sugerindo um efeito centralmente mediado. Esse efeito foi revertido pelo agonista canabinóide, sugerindo uma ação mediada pelos receptores CB1 cerebrais.
- O bloqueio central do receptor CB1 reduziu as concentrações plasmáticas de álcool após administração aguda, sem afetar a coordenação motora, sugerindo que não afetou o desenvolvimento de tolerância aguda ao etanol. Esse efeito na alcoolemia foi revertido pelo agonista WIN55,212-2, sugerindo um efeito mediado pelos receptores CB1 cerebrais.
- O bloqueio central dos receptores CB1 pelo antagonista SR141716 não alterou o volume urinário de ratos tratados com etanol, mas reduziu a concentração de etanol na urina em relação ao grupo controle.
- A administração sistêmica de etanol reduziu a pressão arterial em ratos anestesiados sem alterar a frequência cardíaca. O bloqueio CB1 central por SR141716 numa dose que não alterou os valores cardiovasculares basais (PA e FC), aumentou significativamente a frequência cardíaca em ratos anestesiados e tratados com etanol, sugerindo uma possível participação dos receptores CB1 nas alterações cardiovasculares promovidas pelo álcool.
- Tomados em conjunto, os dados do presente trabalho, sugerem um envolvimento importante dos receptores CB1 cerebrais na tolerância e sensibilidade ao etanol, bem como na frequência cardíaca e nas concentrações plasmáticas de etanol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, I. B. e Martin, B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. Addiction, v.91, n.11, Nov, p.1585-614. 1996.
- Aguayo, L. G., Peoples, R. W., Yeh, H. H. e Yevenes, G. E. GABA(A) receptors as molecular sites of ethanol action. Direct or indirect actions? Curr Top Med Chem, v.2, n.8, Aug, p.869-85. 2002.
- Allan, A. M. e Harris, R. A. Gamma-aminobutyric acid and alcohol actions: neurochemical studies of long sleep and short sleep mice. Life Sci, v.39, n.21, Nov 24, p.2005-15. 1986.
- Ameri, A. The effects of cannabinoids on the brain. Prog Neurobiol, v.58, n.4, Jul, p.315-48. 1999.
- American Psychiatric Association. and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: Dsm-iv-tr. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- Apte, M. V., Norton, I. D., Haber, P. S., Korsten, M. A., Mccaughan, G. W., Pirola, R. C. e Wilson, J. S. Chronic ethanol administration decreases rat pancreatic GP2 content. Biochim Biophys Acta, v.1336, n.1, Jul 19, p.89-98. 1997.
- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiebot, M. H., Poncelet, M., Soubrie, P. e Le Fur, G. Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl), v.132, n.1, Jul, p.104-6. 1997.
- Arvola, A., Sammalisto, L. e Wallgren, H. A test for level of alcohol intoxication in the rat. Q J Stud Alcohol, v.19, n.4, Dec, p.563-72. 1958.
- Badger, T. M., Hidestrand, M., Shankar, K., Mcguinn, W. D. e Ronis, M. J. The effects of pregnancy on ethanol clearance. Life Sci, v.77, n.17, Sep 9, p.2111-26. 2005.
- Badger, T. M., Ronis, M. J., Ingelman-Sundberg, M. e Hakkak, R. Pulsatile blood alcohol and CYP2E1 induction during chronic alcohol infusions in rats. Alcohol, v.10, n.6, Nov-Dec, p.453-7. 1993.
- Ballard, H. S. The hematological complications of alcoholism. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.42-52. 1997.
- Basavarajappa, B. S., Cooper, T. B. e Hungund, B. L. Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. Brain Res, v.793, n.1-2, May 18, p.212-8. 1998.
- Basavarajappa, B. S. e Hungund, B. L. Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells. J Neurochem, v.72, n.2, Feb, p.522-8. 1999.
- Basavarajappa, B. S. e Hungund, B. L. Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. Brain Res, v.815, n.1, Jan 2, p.89-97. 1999.
- Basavarajappa, B. S. e Hungund, B. L. Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.66, n.2-3, Feb-Mar, p.287-99. 2002.
- Basavarajappa, B. S. e Hungund, B. L. Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol. Alcohol Alcohol, v.40, n.1, Jan-Feb, p.15-24. 2005.

- Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B. e Hungund, B. L. Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. Biochem Biophys Acta, v.1535, n.1, Dec 15, p.78-86. 2000.
- Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B. e Hungund, B. L. Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. Eur J Pharmacol, v.466, n.1-2, Apr 11, p.73-83. 2003.
- Batista, L. C., Prediger, R. D., Morato, G. S. e Takahashi, R. N. Blockade of adenosine and dopamine receptors inhibits the development of rapid tolerance to ethanol in mice. Psychopharmacology (Berl), v.181, n.4, Oct, p.714-21. 2005.
- Bernstein, J., Videla, L. e Israel, Y. Hormonal influences in the development of the hypermetabolic state of the liver produced by chronic administration of ethanol. J Pharmacol Exp Ther, v.192, n.3, Mar, p.583-91. 1975.
- Berridge, K. C. Pleasures of the brain. Brain Cogn, v.52, n.1, Jun, p.106-28. 2003.
- Bisogno, T., Sepe, N., Melck, D., Maurelli, S., De Petrocellis, L. e Di Marzo, V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. Biochem J, v.322 (Pt 2), Mar 1, p.671-7. 1997.
- Bitran, M. e Kalant, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. Pharmacol Biochem Behav, v.39, n.4, Aug, p.917-22. 1991.
- Bode, C. e Bode, J. C. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.76-83. 1997.
- Boothby, L. A. e Doering, P. L. Acamprosate for the treatment of alcohol dependence. Clin Ther, v.27, n.6, Jun, p.695-714. 2005.
- Bowers, B. J. e Wehner, J. M. Ethanol consumption and behavioral impulsivity are increased in protein kinase Cgamma null mutant mice. J Neurosci, v.21, n.21, Nov 1, p.RC180. 2001.
- Breivogel, C. S. e Childers, S. R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. Neurobiol Dis, v.5, n.6 Pt B, Dec, p.417-31. 1998.
- Bruggemann, E. P. e Melchior, D. L. Alterations in the organization of phosphatidylcholine/cholesterol bilayers by tetrahydrocannabinol. J Biol Chem, v.258, n.13, Jul 10, p.8298-303. 1983.
- Caballeria, J. Current concepts in alcohol metabolism. Ann Hepatol, v.2, n.2, Apr-Jun, p.60-8. 2003.
- Cardoso, R. A., Brozowski, S. J., Chavez-Noriega, L. E., Harpold, M., Valenzuela, C. F. e Harris, R. A. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. J Pharmacol Exp Ther, v.289, n.2, May, p.774-80. 1999.
- Carta, M., Ariwodola, O. J., Weiner, J. L. e Valenzuela, C. F. Alcohol potently inhibits the kainate receptor-dependent excitatory drive of hippocampal interneurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.11, May 27, p.6813-8. 2003.
- CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. In I Levantamento Domiciliar de Consumo de Entorpecentes. UNIFESP-EPM. 2002.
- Chandler, L. J., Harris, R. A. e Crews, F. T. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. Trends Pharmacol Sci, v.19, n.12, Dec, p.491-5. 1998.

- CISA - Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. História do Álcool. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br>>. Acesso em 10/12/2005).
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R. e Gessa, G. L. Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR-141716. Alcohol Alcohol, v.33, n.2, Mar-Apr, p.126-30. 1998.
- Crabbe, J. C., Rigter, H., Uijlen, J. e Strijbos, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. J Pharmacol Exp Ther, v.208, n.1, Jan, p.128-33. 1979.
- Czaja, C. e Kalant, H. The effect of acute alcoholic intoxication on adrenal ascorbic acid and cholesterol in the rat. Can J Biochem Physiol, v.39, Feb, p.327-34. 1961.
- Da Silva, G. E., Morato, G. S. e Takahashi, R. N. Rapid tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between ethanol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. Eur J Pharmacol, v.431, n.2, Nov 16, p.201-7. 2001.
- Davies, D. L., Machu, T. K., Guo, Y. e Alkana, R. L. Ethanol sensitivity in ATP-gated P2X receptors is subunit dependent. Alcohol Clin Exp Res, v.26, n.6, Jun, p.773-8. 2002.
- De Witte, P., Littleton, J., Parot, P. e Koob, G. Neuroprotective and abstinence-promoting effects of acamprosate: elucidating the mechanism of action. CNS Drugs, v.19, n.6, p.517-37. 2005.
- Debellis, R., Smith, B. S., Choi, S. e Malloy, M. Management of delirium tremens. J Intensive Care Med, v.20, n.3, May-Jun, p.164-73. 2005.
- Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S. e Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol, v.34, n.5, Nov, p.605-13. 1988.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. e Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, v.258, n.5090, Dec 18, p.1946-9. 1992.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. e Bisogno, T. Anandamide receptors. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.66, n.2-3, Feb-Mar, p.377-91. 2002.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Sugiura, T. e Waku, K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. Biochem Biophys Res Commun, v.227, n.1, Oct 3, p.281-8. 1996.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. e Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature, v.372, n.6507, Dec 15, p.686-91. 1994.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. e De Petrocellis, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci, v.21, n.12, Dec, p.521-8. 1998.
- El-Mas, M. M. e Abdel-Rahman, A. A. Role of aortic baroreceptors in ethanol-induced impairment of baroreflex control of heart rate in conscious rats. J Pharmacol Exp Ther, v.262, n.1, Jul, p.157-65. 1992.
- El-Mas, M. M. e Abdel-Rahman, A. A. Role of NMDA and non-NMDA receptors in the nucleus tractus solitarius in the depressant effect of ethanol on baroreflexes. J Pharmacol Exp Ther, v.266, n.2, Aug, p.602-10. 1993.
- Emanuele, N. e Emanuele, M. A. The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.53-64. 1997.

- Epstein, M. Alcohol's impact on kidney function. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.84-92. 1997.
- Fadda, F. e Rossetti, Z. L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Prog Neurobiol, v.56, n.4, Nov, p.385-431. 1998.
- Feller, D. J., Young, E. R., Riggan, J. P., Stuart, J. e Crabbe, J. C. Serotonin and genetic differences in sensitivity and tolerance to ethanol hypothermia. Psychopharmacology (Berl), v.112, n.2-3, p.331-8. 1993.
- Freund, T. F., Katona, I. e Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev, v.83, n.3, Jul, p.1017-66. 2003.
- Fride, E. Anandamides: tolerance and cross-tolerance to delta 9-tetrahydrocannabinol. Brain Res, v.697, n.1-2, Oct 30, p.83-90. 1995.
- Gallate, J. E., Mallet, P. E. e Mcgregor, I. S. Combined low dose treatment with opioid and cannabinoid receptor antagonists synergistically reduces the motivation to consume alcohol in rats. Psychopharmacology (Berl), v.173, n.1-2, Apr, p.210-6. 2004.
- Gallate, J. E. e Mcgregor, I. S. The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716. Psychopharmacology (Berl), v.142, n.3, Mar, p.302-8. 1999.
- Gessa, G. L., Serra, S., Vacca, G., Carai, M. A. e Colombo, G. Suppressing effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats. Alcohol Alcohol, v.40, n.1, Jan-Feb, p.46-53. 2005.
- Gibbins, R. J., Kalant, H., Leblanc, A. E. e Clark, J. W. The effects of chronic administration of ethanol on startle thresholds in rats. Psychopharmacologia, v.19, n.2, p.95-104. 1971.
- Giuffrida, A., Parsons, L. H., Kerr, T. M., Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M. e Piomelli, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat Neurosci, v.2, n.4, Apr, p.358-63. 1999.
- Gomez, R., Navarro, M., Ferrer, B., Trigo, J. M., Bilbao, A., Del Arco, I., Cippitelli, A., Nava, F., Piomelli, D. e Rodriguez De Fonseca, F. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. J Neurosci, v.22, n.21, Nov 1, p.9612-7. 2002.
- Gonzalez, S., Valenti, M., De Miguel, R., Fezza, F., Fernandez-Ruiz, J., Di Marzo, V. e Ramos, J. A. Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. Br J Pharmacol, v.143, n.4, Oct, p.455-64. 2004.
- Grinspoon, L. e Bakalar, J. B. Marijuana as medicine. A plea for reconsideration. Jama, v.273, n.23, Jun 21, p.1875-6. 1995.
- Grobin, A. C., Matthews, D. B., Devaud, L. L. e Morrow, A. L. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. Psychopharmacology (Berl), v.139, n.1-2, Sep, p.2-19. 1998.
- Harris, R. A. Distinct actions of alcohols, barbiturates and benzodiazepines on GABA-activated chloride channels. Alcohol, v.7, n.3, May-Jun, p.273-5. 1990.
- Harris, R. A. Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? Alcohol Clin Exp Res, v.23, n.10, Oct, p.1563-70. 1999.
- Harris, R. A., Mcquilkiln, S. J., Paylor, R., Abeliovich, A., Tonegawa, S. e Wehner, J. M. Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.9, Apr 25,

- p.3658-62. 1995.
- Heishman, S. J., Arasteh, K. e Stitzer, M. L. Comparative effects of alcohol and marijuana on mood, memory, and performance. Pharmacol Biochem Behav, v.58, n.1, Sep, p.93-101. 1997.
- Herkenhan. Laboratory of Cellular and Molecular Regulation, IRP. National Institute of Mental Health. Laboratory of Cellular and Molecular Regulation, IRP. National Institute of Mental Health. Disponível em:<<http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/sfn/cannabis.html>>. Acesso em 20/06/2005.
- Heyser, C. J., Moc, K. e Koob, G. F. Effects of naltrexone alone and in combination with acamprosate on the alcohol deprivation effect in rats. Neuropsychopharmacology, v.28, n.8, Aug, p.1463-71. 2003.
- Hodges, H., Allen, Y., Sinden, J., Mitchell, S. N., Arendt, T., Lantos, P. L. e Gray, J. A. The effects of cholinergic drugs and cholinergic-rich foetal neural transplants on alcohol-induced deficits in radial maze performance in rats. Behav Brain Res, v.43, n.1, Apr 18, p.7-28. 1991.
- Hoffman, P. L. e Tabakoff, B. The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. Exs, v.71, p.61-70. 1994.
- Hollister, L. E. e Gillespie, H. K. Marihuana, ethanol, and dextroamphetamine. Mood and mental function alterations. Arch Gen Psychiatry, v.23, n.3, Sep, p.199-203. 1970.
- Homanics, G. E., Le, N. Q., Kist, F., Mihalek, R., Hart, A. R. e Quinlan, J. J. Ethanol tolerance and withdrawal responses in GABA(A) receptor alpha 6 subunit null allele mice and in inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mice. Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.1, Feb, p.259-65. 1998.
- Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R. e Herkenham, M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. Trends Neurosci, v.13, n.10, Oct, p.420-3. 1990.
- Hungund, B. L. e Basavarajappa, B. S. Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence. Alcohol Alcohol, v.35, n.2, Mar-Apr, p.126-33. 2000.
- Hungund, B. L. e Basavarajappa, B. S. Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. J Neurosci Res, v.60, n.1, Apr 1, p.122-8. 2000.
- Hungund, B. L., Goldstein, D. B., Villegas, F. e Cooper, T. B. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. Biochem Pharmacol, v.37, n.15, Aug 1, p.3001-4. 1988.
- Hungund, B. L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B. S. e Vadasz, C. Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. J Neurochem, v.84, n.4, Feb, p.698-704. 2003.
- Iversen, L. Cannabis and the brain. Brain, v.126, n.Pt 6, Jun, p.1252-70. 2003.
- Jho, D. H., Engelhard, H. H., Juarez, A. e Espat, N. J. Simplified surgical placement and stabilization methods for intracerebroventricular cannulas in rat lateral ventricles. Lab Anim (NY), v.32, n.9, Oct, p.43-8. 2003.
- Julian, M. D., Martin, A. B., Cuellar, B., Rodriguez De Fonseca, F., Navarro, M., Moratalla, R. e Garcia-Segura, L. M. Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. Neuroscience, v.119, n.1, p.309-18. 2003.
- Kalant, H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. Addict Biol, v.1, n.2, p.133-41. 1996.

- Kalant, H., Leblanc, A. E. e Gibbins, R. J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. Pharmacol Rev, v.23, n.3, Sep, p.135-91. 1971.
- Kalant, H., Leblanc, A. E. e Gibbins, R. J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. Pharmacol Rev, v.23, n.3, Sep, p.135-91. 1971.
- Khanna, J. M., Morato, G. S. e Kalant, H. Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. Pharmacol Biochem Behav, v.72, n.1-2, May, p.291-8. 2002.
- Khanna, J. M., Chau, A. e Shah, G. Characterization of the Phenomenon of rapid tolerance to ethanol. Alcohol, v.13, n.6, Nov-Dec, p.621-8. 1996.
- Khanna, J. M., Kalant, H., Chau, A., Shah, G. e Morato, G. S. Interaction between N-methyl-D-aspartate (NMDA) and serotonin (5-HT) on ethanol tolerance. Brain Res Bull, v.35, n.1, p.31-5. 1994.
- Khanna, J. M., Morato, G. S., Shah, G., Chau, A. e Kalant, H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. Brain Res Bull, v.32, n.1, p.43-7. 1993.
- Khanna, J. M., Kalant, H., Weiner, J. e Shah, G. Rapid tolerance and cross-tolerance as predictors of chronic tolerance and cross-tolerance. Pharmacol Biochem Behav, v.41, n.2, Feb, p.355-60. 1992.
- Khanna, J. M., Kalant, H., Shah, G. e Chau, A. Effect of (+)MK-801 and ketamine on rapid tolerance to ethanol. Brain Res Bull, v.28, n.2, Feb, p.311-4. 1992.
- Khanna, J. M., Kalant, H., Shah, G. e Chau, A. Tolerance to ethanol and cross-tolerance to pentobarbital and barbital in four rat strains. Pharmacol Biochem Behav, v.39, n.3, Jul, p.705-9. 1991.
- Khanna, J. M., Wu, P. H., Weiner, J. e Kalant, H. NMDA antagonist inhibits rapid tolerance to ethanol. Brain Res Bull, v.26, n.4, Apr, p.643-5. 1991.
- Khanna, J. M., Kalant, H., Chau, A. K. e Sharma, H. Initial sensitivity, acute tolerance and alcohol consumption in four inbred strains of rats. Psychopharmacology (Berl), v.101, n.3, p.390-5. 1990.
- Kobayashi, T., Ikeda, K., Kojima, H., Niki, H., Yano, R., Yoshioka, T. e Kumanishi, T. Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. Nat Neurosci, v.2, n.12, Dec, p.1091-7. 1999.
- Koob, G. F. e Weiss, F. Neuropharmacology of cocaine and ethanol dependence. Recent Dev Alcohol, v.10, p.201-33. 1992.
- Koura, Y., Ichihara, A., Tada, Y., Kaneshiro, Y., Okada, H., Temm, C. J., Hayashi, M. e Saruta, T. Anandamide decreases glomerular filtration rate through predominant vasodilation of efferent arterioles in rat kidneys. J Am Soc Nephrol, v.15, n.6, Jun, p.1488-94. 2004.
- Kreitzer, A. C. e Regehr, W. G. Retrograde signaling by endocannabinoids. Curr Opin Neurobiol, v.12, n.3, Jun, p.324-30. 2002.
- Kristoffersen, L., Skuterud, B., Larssen, B. R., Skurtveit, S. e Smith-Kielland, A. Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol dehydrogenase method. Optimization by experimental design. J Anal Toxicol, v.29, n.1, Jan-Feb, p.66-70. 2005.
- Kristoffersen, L. e Smith-Kielland, A. An automated alcohol dehydrogenase method for ethanol quantification in urine and whole blood. J Anal Toxicol, v.29, n.5, Jul-Aug, p.387-9. 2005.
- Krystal, J. H., Petrakis, I. L., Mason, G., Trevisan, L. e D'souza, D. C. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. Pharmacol Ther, v.99, n.1, Jul, p.79-94. 2003.

- Kumari, M. e Ticku, M. K. Regulation of NMDA receptors by ethanol. Prog Drug Res, v.54, p.152-89. 2000.
- Kurtz, D. L., Stewart, R. B., Zweifel, M., Li, T. K. e Froehlich, J. C. Genetic differences in tolerance and sensitization to the sedative/hypnotic effects of alcohol. Pharmacol Biochem Behav, v.53, n.3, Mar, p.585-91. 1996.
- Lallemant, F. e De Witte, P. Ethanol induces higher BEC in CB1 cannabinoid receptor knockout mice while decreasing ethanol preference. Alcohol Alcohol, v.40, n.1, Jan-Feb, p.54-62. 2005.
- Lallemant, F., Soubrie, P. e De Witte, P. Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic alcohol administration combined with repeated re-exposures and withdrawals. Alcohol Alcohol, v.39, n.6, Nov-Dec, p.486-92. 2004.
- Laposata, E. A. e Lange, L. G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. Science, v.231, n.4737, Jan 31, p.497-9. 1986.
- Larson, S. J. e Siegel, S. Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. Pharmacol Biochem Behav, v.61, n.1, Sep, p.131-42. 1998.
- Laurent, B. e Roy, P. E. Alteration of membrane integrity by delta1-tetrahydrocannabinol. Int J Clin Pharmacol Biopharm, v.12, n.1-2, Jul, p.261-6. 1975.
- Le, A. D. e Kalant, H. Influence of intoxicated practice on the development of acute tolerance to the motor impairment effect of ethanol. Psychopharmacology (Berl), v.106, n.4, p.572-6. 1992.
- Le, A. D., Khanna, J. M., Kalant, H. e Leblanc, A. E. Effect of modification of brain serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) on ethanol tolerance. Psychopharmacology (Berl), v.75, n.3, p.231-5. 1981.
- Leblanc, A. E., Kalant, H. e Gibbins, R. J. Acute tolerance to ethanol in the rat. Psychopharmacologia, v.41, n.1, p.43-6. 1975.
- Lewohl, J. M., Wilson, W. R., Mayfield, R. D., Brozowski, S. J., Morrisett, R. A. e Harris, R. A. G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. Nat Neurosci, v.2, n.12, Dec, p.1084-90. 1999.
- Lieber, C. S. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. Clin Chim Acta, v.257, n.1, Jan 3, p.59-84. 1997.
- Lister, R. G. The effects of repeated doses of ethanol on exploration and its habituation. Psychopharmacology (Berl), v.92, n.1, p.78-83. 1987.
- Littleton, J. e Little, H. Current concepts of ethanol dependence. Addiction, v.89, n.11, Nov, p.1397-412. 1994.
- Littleton, J. M., John, G. R., Jones, P. A. e Grieve, S. J. The rapid onset of functional tolerance to ethanol--role of different neurotransmitters and synaptosomal membrane lipids. Acta Psychiatr Scand Suppl, v.286, p.137-51. 1980.
- Loh, E. W. e Ball, D. Role of the GABA(A)beta2, GABA(A)alpha6, GABA(A)alpha1 and GABA(A)gamma2 receptor subunit genes cluster in drug responses and the development of alcohol dependence. Neurochem Int, v.37, n.5-6, Nov-Dec, p.413-23. 2000.
- Lovinger, D. M., Sung, K. W. e Zhou, Q. Ethanol and trichloroethanol alter gating of 5-HT3 receptor-channels in NCB-20 neuroblastoma cells. Neuropharmacology, v.39, n.4, Feb 14, p.561-70. 2000.
- Lovinger, D. M. e White, G. Ethanol potentiation of 5-hydroxytryptamine3 receptor-mediated ion current in neuroblastoma cells and isolated adult mammalian neurons. Mol Pharmacol, v.40, n.2, Aug, p.263-70.

- 1991.
- Lovinger, D. M., White, G. e Weight, F. F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. Science, v.243, n.4899, Mar 31, p.1721-4. 1989.
- Lucas, D. L., Brown, R. A., Wassef, M. e Giles, T. D. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. J Am Coll Cardiol, v.45, n.12, Jun 21, p.1916-24. 2005.
- Macavoy, M. G. e Marks, D. F. Divided attention performance of cannabis users and non-users following cannabis and alcohol. Psychopharmacologia, v.44, n.2, Oct 31, p.147-52. 1975.
- Macdonald, R. L. Ethanol, gamma-aminobutyrate type A receptors, and protein kinase C phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.9, Apr 25, p.3633-5. 1995.
- Maher, J. J. Exploring alcohol's effects on liver function. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.5-12. 1997.
- Maldve, R. E., Zhang, T. A., Ferrani-Kile, K., Schreiber, S. S., Lippmann, M. J., Snyder, G. L., Fienberg, A. A., Leslie, S. W., Gonzales, R. A. e Morrisett, R. A. DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens. Nat Neurosci, v.5, n.7, Jul, p.641-8. 2002.
- Manzanares, J., Corchero, J. e Fuentes, J. A. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. Brain Res, v.839, n.1, Aug 21, p.173-9. 1999.
- Manzanares, J., Ortiz, S., Oliva, J. M., Perez-Rial, S. e Palomo, T. Interactions between cannabinoid and opioid receptor systems in the mediation of ethanol effects. Alcohol Alcohol, v.40, n.1, Jan-Feb, p.25-34. 2005.
- Marks, D. F. e Macavoy, M. G. Divided attention performance in cannabis users and non-users following alcohol and cannabis separately and in combination. Psychopharmacology (Berl), v.99, n.3, p.397-401. 1989.
- Masur, J. e Del Porto, J. A. Alcoolismo. Ciência Hoje, v.1, n.2, p.56-60. 1982.
- Masur, J. A questão do alcoolismo. Ed. Brasiliense, p.77. 1984.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. e Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, v.346, n.6284, Aug 9, p.561-4. 1990.
- Matsumoto, H., Fujimiya, T. e Fukui, Y. Role of alcohol dehydrogenase in rat ethanol elimination kinetics. Alcohol Alcohol Suppl, v.29, n.1, p.15-20. 1994.
- Matsumoto, H. e Fukui, Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. Addict Biol, v.7, n.1, Jan, p.5-14. 2002.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B. R., Compton, D. R. e Et Al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol, v.50, n.1, Jun 29, p.83-90. 1995.
- Mendelson, J. H. e Mello, N. K. Experimental analysis of drinking behavior of chronic alcoholics. Ann N Y Acad Sci, v.133, n.3, Sep 23, p.828-45. 1966.
- Michaelis, M. L. e Michaelis, E. K. Effects of ethanol on NMDA receptors in brain: possibilities for Mg(2+)-ethanol interactions. Alcohol Clin Exp Res, v.18, n.5, Oct, p.1069-75. 1994.
- Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela,

- C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A. e Harrison, N. L. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. Nature, v.389, n.6649, Sep 25, p.385-9. 1997.
- Modesto-Lowe, V. e Fritz, E. M. The opioidergic-alcohol link : implications for treatment. CNS Drugs, v.19, n.8, p.693-707. 2005.
- Morato, G. S. e Khanna, J. M. N-methyl-D-aspartate receptors, nitric oxide, and ethanol tolerance. Braz J Med Biol Res, v.29, n.11, Nov, p.1415-26. 1996.
- Munro, S., Thomas, K. L. e Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature, v.365, n.6441, Sep 2, p.61-5. 1993.
- Myers, R. D. e Lankford, M. F. Suppression of alcohol preference in high alcohol drinking rats: efficacy of amperozide versus naltrexone. Neuropsychopharmacology, v.14, n.2, Feb, p.139-49. 1996.
- Myrick, H. e Anton, R. F. Treatment of alcohol withdrawal. Alcohol Health Res World, v.22, n.1, p.38-43. 1998.
- Naassila, M., Pierrefiche, O., Ledent, C. e Daoust, M. Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. Neuropharmacology, v.46, n.2, Feb, p.243-53. 2004.
- Nestler, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. Neuropharmacology, v.47 Suppl 1, p.24-32. 2004.
- Newman, L. M., Lutz, M. P., Gould, M. H. e Domino, E. F. 9 -Tetrahydrocannabinol and ethyl alcohol: evidence for cross-tolerance in the rat. Science, v.175, n.25, Mar 3, p.1022-3. 1972.
- Nie, Y., Stubbs, C. D., Williams, B. W. e Rubin, E. Ethanol causes decreased partitioning into biological membranes without changes in lipid order. Arch Biochem Biophys, v.268, n.1, Jan, p.349-59. 1989.
- Olive, M. F., Mehmert, K. K., Messing, R. O. e Hodge, C. W. Reduced operant ethanol self-administration and in vivo mesolimbic dopamine responses to ethanol in PKCepsilon-deficient mice. Eur J Neurosci, v.12, n.11, Nov, p.4131-40. 2000.
- Ortiz, S., Oliva, J. M., Perez-Rial, S., Palomo, T. e Manzanares, J. Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. Alcohol Alcohol, v.39, n.2, Mar-Apr, p.88-92. 2004.
- Pandey, S. C. Neuronal signaling systems and ethanol dependence. Mol Neurobiol, v.17, n.1-3, Winter, p.1-15. 1998.
- Paxinos, G. e Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Academic Press. 1997
- Perra, S., Pillolla, G., Melis, M., Muntoni, A. L., Gessa, G. L. e Pistis, M. Involvement of the endogenous cannabinoid system in the effects of alcohol in the mesolimbic reward circuit: electrophysiological evidence in vivo. Psychopharmacology (Berl), v.183, n.3, Dec, p.368-77. 2005.
- Pertwee, R. G., Stevenson, L. A. e Griffin, G. Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. Br J Pharmacol, v.110, n.4, Dec, p.1483-90. 1993.
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci, v.4, n.11, Nov, p.873-84. 2003.
- Pohorecky, L. A. Effect of ethanol on urine output in rats. Alcohol, v.2, n.5, Sep-Oct, p.659-66. 1985.
- Pohorecky, L. A. e Brick, J. Pharmacology of ethanol. Pharmacol Ther, v.36, n.2-3, p.335-427. 1988.

- Poncelet, M., Maruani, J., Calassi, R. e Soubrie, P. Overeating, alcohol and sucrose consumption decrease in CB1 receptor deleted mice. Neurosci Lett, v.343, n.3, Jun 12, p.216-8. 2003.
- Programa Álcool e Drogas (PAD) do Hospital Israelita Albert Einstein. Site Álcool e Drogas sem Distorção. História da Maconha. Disponível em: <www.einsten.br/alcooledrogas>. Acesso em 10/12/2005.
- Puddey, I. B., Zilkens, R. R., Croft, K. D. e Beilin, L. J. Alcohol and endothelial function: a brief review. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.28, n.12, Dec, p.1020-4. 2001.
- Quadros, I. M., Nobrega, J. N., Hipolide, D. C. e Souza-Formigoni, M. L. Increased brain dopamine D4-like binding after chronic ethanol is not associated with behavioral sensitization in mice. Alcohol, v.37, n.2, Oct, p.99-104. 2005.
- Quintanilla, M. E. e Tampier, L. Effect of naltrexone on acute tolerance to ethanol in UChB rats. Alcohol, v.21, n.3, Jul, p.245-9. 2000.
- Rademacher, D. J., Patel, S., Hopp, F. A., Dean, C., Hillard, C. J. e Seagard, J. L. Microinjection of a cannabinoid receptor antagonist into the NTS increases baroreflex duration in dogs. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.284, n.5, May, p.H1570-6. 2003.
- Radlow, R. A quantitative theory of acute tolerance to alcohol. Psychopharmacology (Berl), v.114, n.1, Feb, p.1-8. 1994.
- Ragland, G. Electrolyte abnormalities in the alcoholic patient. Emerg Med Clin North Am, v.8, n.4, Nov, p.761-73. 1990.
- Rezvani, A. H., Overstreet, D. H., Mason, G. A., Janowsky, D. S., Hamed, M., Clark, E., Jr. e Yang, Y. Combination pharmacotherapy: a mixture of small doses of naltrexone, fluoxetine, and a thyrotropin-releasing hormone analogue reduces alcohol intake in three strains of alcohol-preferring rats. Alcohol Alcohol, v.35, n.1, Jan, p.76-83. 2000.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D. e Et Al. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett, v.350, n.2-3, Aug 22, p.240-4. 1994.
- Roberto, M., Madamba, S. G., Moore, S. D., Tallent, M. K. e Siggins, G. R. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.4, Feb 18, p.2053-8. 2003.
- Rodrigo, R., Thielemann, L., Olea, M., Munoz, P., Cereceda, M. e Orellana, M. Effect of ethanol ingestion on renal regulation of water and electrolytes. Arch Med Res, v.29, n.3, Autumn, p.209-18. 1998.
- Rodriguez De Fonseca, F., Del Arco, I., Martin-Calderon, J. L., Gorriti, M. A. e Navarro, M. Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. Neurobiol Dis, v.5, n.6 Pt B, Dec, p.483-501. 1998.
- Ron, D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. Neuroscientist, v.10, n.4, Aug, p.325-36. 2004.
- Roth, S. H. e Williams, P. J. The non-specific membrane binding properties of delta9-tetrahydrocannabinol and the effects of various solubilizers. J Pharm Pharmacol, v.31, n.4, Apr, p.224-30. 1979.
- Saitz, R. Introduction to alcohol withdrawal. Alcohol Health Res World, v.22, n.1, p.5-12. 1998.
- Salaspuro, V., Nyfors, S., Heine, R., Siitonen, A., Salaspuro, M. e Jousimies-Somer, H. Ethanol oxidation and acetaldehyde production in vitro by human intestinal strains of Escherichia coli under aerobic,

- microaerobic, and anaerobic conditions. Scand J Gastroenterol, v.34, n.10, Oct, p.967-73. 1999.
- Sanudo-Pena, M. C., Tsou, K. e Walker, J. M. Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. Life Sci, v.65, n.6-7, p.703-13. 1999.
- Schlicker, E. e Kathmann, M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci, v.22, n.11, Nov, p.565-72. 2001.
- Schuckit, M. A. Biological markers in alcoholism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.10, n.2, p.191-9. 1986.
- Schuckit, M. A. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. Am J Psychiatry, v.151, n.2, Feb, p.184-9. 1994.
- Scott, L. J., Figgitt, D. P., Keam, S. J. e Waugh, J. Acamprosate: a review of its use in the maintenance of abstinence in patients with alcohol dependence. CNS Drugs, v.19, n.5, p.445-64. 2005.
- Seagard, J. L., Dean, C., Patel, S., Rademacher, D. J., Hopp, F. A., Schmeling, W. T. e Hillard, C. J. Anandamide content and interaction of endocannabinoid/GABA modulatory effects in the NTS on baroreflex-evoked sympathoinhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.286, n.3, Mar, p.H992-1000. 2004.
- Seagard, J. L., Hopp, F. A., Hillard, C. J. e Dean, C. Effects of endocannabinoids on discharge of baroreceptive NTS neurons. Neurosci Lett, v.381, n.3, Jun 24, p.334-9. 2005.
- Snell, L. D., Nunley, K. R., Lickteig, R. L., Browning, M. D., Tabakoff, B. e Hoffman, P. L. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. Brain Res Mol Brain Res, v.40, n.1, Aug, p.71-8. 1996.
- Sprague, G. L. e Craigmill, A. L. Ethanol and delta-9-tetrahydrocannabinol: mechanism for cross-tolerance in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.5, n.4, Oct, p.409-15. 1976.
- Stella, N., Schweitzer, P. e Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature, v.388, n.6644, Aug 21, p.773-8. 1997.
- Stromberg, M. F. The effect of baclofen alone and in combination with naltrexone on ethanol consumption in the rat. Pharmacol Biochem Behav, v.78, n.4, Aug, p.743-50. 2004.
- Sunahara, G. I., Kalant, H., Schofield, M. e Grupp, L. Regional distribution of ethanol in the rat brain. Can J Physiol Pharmacol, v.56, n.6, Dec, p.988-92. 1978.
- Suzdak, P. D., Schwartz, R. D., Skolnick, P. e Paul, S. M. Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneuroosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.11, Jun, p.4071-5. 1986.
- Szabo, G. Alcohol's contribution to compromised immunity. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.30-41. 1997.
- Tabakoff, B. e Hoffman, P. L. Alcohol interactions with brain opiate receptors. Life Sci, v.32, n.3, Jan 17, p.197-204. 1983.
- Tabakoff, B. e Hoffman, P. L. Alcohol addiction: an enigma among us. Neuron, v.16, n.5, May, p.909-12. 1996.
- Taberner, P. V. The GABA system in functional tolerance and dependence following barbiturates, benzodiazepines or ethanol--correlation or causality? Comp Biochem Physiol A, v.93, n.1, p.241-5.

1989.

- Takahashi, R. N., Pamplona, F. A. e Fernandes, M. S. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. Neurosci Lett, v.380, n.3, Jun 3, p.270-5. 2005.
- Tampier, L. e Quintanilla, M. E. Involvement of brain ethanol metabolism on acute tolerance development and on ethanol consumption in alcohol-drinker (UChB) and non-drinker (UChA) rats. Addict Biol, v.8, n.3, Sep, p.279-86. 2003.
- Tampier, L. e Quintanilla, M. E. Effect of a dose of ethanol on acute tolerance and ethanol consumption in alcohol drinker(UChB) and non-drinker (UChA) rats. Addict Biol, v.7, n.3, Jul, p.279-84. 2002.
- Tampier, L., Quintanilla, M. E. e Mardones, J. Acute tolerance, alcohol sensitivity and drinking pattern in the F2 generation of UChA and UChB rats. J Stud Alcohol, v.61, n.5, Sep, p.647-51. 2000.
- Thurman, R. G. e Mckenna, W. R. Pathways of ethanol metabolism in perfused rat liver. Adv Exp Med Biol, v.56, p.57-76. 1975.
- Thurman, R. G., Mckenna, W. R. e Mccaffrey, T. B. Pathways responsible for the adaptive increase in ethanol utilization following chronic treatment with ethanol: inhibitor studies with the hemoglobin-free perfused rat liver. Mol Pharmacol, v.12, n.1, Jan, p.156-66. 1976.
- Thurman, R. G., Paschal, D., Abu-Murad, C., Pekkanen, L., Bradford, B. U., Bullock, K. e Glassman, E. Swift increase in alcohol metabolism (SIAM) in the mouse: comparison of the effect of short-term ethanol treatment on ethanol elimination in four inbred strains. J Pharmacol Exp Ther, v.223, n.1, Oct, p.45-9. 1982.
- Thurman, R. G. e Scholz, R. Interaction of glycolysis and respiration in perfused rat liver. Changes in oxygen uptake following the addition of ethanol. Eur J Biochem, v.75, n.1, May 2, p.13-21. 1977.
- Toki, S., Saito, T., Nabeshima, A., Hatta, S., Watanabe, M. e Takahata, N. Changes in GABAA receptor function and cross-tolerance to ethanol in diazepam-dependent rats. Alcohol Clin Exp Res, v.20, n.1 Suppl, Feb, p.40A-44A. 1996.
- Valverde, O. Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour. Curr Pharm Des, v.11, n.26, p.3421-9. 2005.
- Van Der Stelt, M. e Di Marzo, V. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. Eur J Pharmacol, v.480, n.1-3, Nov 7, p.133-50. 2003.
- Varaschin, R. K., Wazlawik, E. e Morato, G. S. Systemic and intra-accumbens microinjections of naltrexone interfere with tolerance to ethanol in rats. Psychopharmacology (Berl), v.182, n.3, Nov, p.366-74. 2005.
- Varga, K., Lovas, G., Palkovits, M. e Kunos, G. Ethanol inhibition of stress-related tachycardia involves medullary NMDA receptors. Eur J Pharmacol, v.310, n.2-3, Aug 29, p.145-53. 1996.
- Videla, L. e Israel, Y. Factors that modify the metabolism of ethanol in rat liver and adaptive changes produced by its chronic administration. Biochem J, v.118, n.2, Jun, p.275-81. 1970.
- Viveros, M. P., Marco, E. M. e File, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. Pharmacol Biochem Behav, v.81, n.2, Jun, p.331-42. 2005.
- Volpicelli, J. R., Rhines, K. C., Rhines, J. S., Volpicelli, L. A., Alterman, A. I. e O'brien, C. P. Naltrexone and alcohol dependence. Role of subject compliance. Arch Gen Psychiatry, v.54, n.8, Aug, p.737-42. 1997.

- Waller, M. B., McBride, W. J., Lumeng, L. e Li, T. K. Initial sensitivity and acute tolerance to ethanol in the P and NP lines of rats. Pharmacol Biochem Behav, v.19, n.4, Oct, p.683-6. 1983.
- Wallgren, H. e Tirri, R. Studies on the Mechanism of Stress-Induced Reduction of Alcohol Intoxication in Rats. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), v.20, p.27-38. 1963.
- Wang, L., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A. e Kunos, G. Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.3, Feb 4, p.1393-8. 2003.
- Wang, X., Wang, G., Lemos, J. R. e Treistman, S. N. Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel in neurohypophysial terminals. J Neurosci, v.14, n.9, Sep, p.5453-60. 1994.
- Wang, X. M., Lemos, J. R., Dayanithi, G., Nordmann, J. J. e Treistman, S. N. Ethanol reduces vasopressin release by inhibiting calcium currents in nerve terminals. Brain Res, v.551, n.1-2, Jun 14, p.338-41. 1991.
- Wazlawik, E. e Morato, G. S. Effects of intracerebroventricular administration of 7-nitroindazole on tolerance to ethanol. Brain Res Bull, v.57, n.2, Jan 15, p.165-70. 2002.
- Wazlawik, E. e Morato, G. S. Influence of drugs acting on nitric oxide-dependent pathways on ethanol tolerance in rats. Psychopharmacology (Berl), v.170, n.4, Dec, p.343-50. 2003.
- Weiner, J. L. e Valenzuela, C. F. Ethanol modulation of GABAergic transmission: The view from the slice. Pharmacol Ther, Jan 17. 2006.
- Widmer, H., Lemos, J. R. e Treistman, S. N. Ethanol reduces the duration of single evoked spikes by a selective inhibition of voltage-gated calcium currents in acutely dissociated supraoptic neurons of the rat. J Neuroendocrinol, v.10, n.6, Jun, p.399-406. 1998.
- Wilson, R. I. e Nicoll, R. A. Endocannabinoid signaling in the brain. Science, v.296, n.5568, Apr 26, p.678-82. 2002.
- Wing, D. R., Harvey, D. J., Hughes, J., Dunbar, P. G., Mcpherson, K. A. e Paton, W. D. Effects of chronic ethanol administration on the composition of membrane lipids in the mouse. Biochem Pharmacol, v.31, n.21, Nov 1, p.3431-9. 1982.
- Witkin, J. M., Tzavara, E. T. e Nomikos, G. G. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. Behav Pharmacol, v.16, n.5-6, Sep, p.315-31. 2005.
- Wolff, M. C. e Leander, J. D. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. Eur J Pharmacol, v.477, n.3, Sep 23, p.213-7. 2003.
- Wolffgramm, J., Rommelspacher, H. e Buck, E. Ethanol reduces tolerance, sensitization, and up-regulation of D2-receptors after subchronic haloperidol. Pharmacol Biochem Behav, v.36, n.4, Aug, p.907-14. 1990.
- Woodward, J. J. Ethanol and NMDA receptor signaling. Crit Rev Neurobiol, v.14, n.1, p.69-89. 2000.
- Wotjak, C. T. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. Mini Rev Med Chem, v.5, n.7, Jul, p.659-70. 2005.
- Wu, P. H., Tabakoff, B., Szabo, G. e Hoffman, P. L. Chronic ethanol exposure results in increased acute functional tolerance in selected lines of HAFT and LAFT mice. Psychopharmacology (Berl), v.155, n.4, Jun, p.405-12. 2001.
- Yuki, T., Bradford, B. U. e Thurman, R. G. Role of hormones in the mechanism of the swift increase in

- alcohol metabolism in the rat. Pharmacol Biochem Behav, v.13 Suppl 1, p.67-71. 1980.
- Yuki, T. e Thurman, R. G. The swift increase in alcohol metabolism. Time course for the increase in hepatic oxygen uptake and the involvement of glycolysis. Biochem J, v.186, n.1, Jan 15, p.119-26. 1980.
- Zakhari, S. Alcohol and the cardiovascular system: molecular mechanisms for beneficial and harmful action. Alcohol Health Res World, v.21, n.1, p.21-9. 1997.
- Zaleski, M., Morato, G. S., Silva, V. A. e Lemos, T. [Neuropharmacological aspects of chronic alcohol use and withdrawal syndrome]. Rev Bras Psiquiatr, v.26 Suppl 1, May, p.S40-2. 2004.