

INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS ENDOCANABINÓIDE E OPIÓIDE NA ATIVIDADE LOCOMOTORA E NO COMPORTAMENTO DE APRENDIZADO E MEMÓRIA

NUBIA RODRIGUES BATISTA¹, RENATA RODRIGUES CATANI², MARIANA OLIVEIRA RODRIGUES², BENVINDA ROSALINA DOS SANTOS³.

RESUMO

Recentes estudos sobre as bases neurobiológicas do alcoolismo sugerem que o sistema canabinóide endógeno possa desempenhar um papel importante no comportamento induzido pelo etanol, influenciando nos processos de extinção dos comportamentos aprendidos e de aquisição da memória. O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento geral exploratório, memória e aprendizado em camundongos, utilizando open field e plus maze, após tratamento crônico e subcrônico com etanol (EtOH)15% v/v (2,2mg/Kg) e/ou associação de antagonistas de receptores canabinóides endógenos (Rimonabanto(RB)3mg/kg), antagonista NMDA (Dizocilpina (DZC); 0,3mg/kg) e/ou antagonista opióide, Naloxona (Nlx; 5mg/kg) e Morfina (Mor;5mg/Kg), agonista do sistema opióide. Foi observado o aumento significativo da atividade locomotora espontânea dos animais tratados agudamente com etanol e naqueles com co-administração de antagonistas opióides e canabinóides. Entretanto em animais tratados sub e cronicamente com RB, não houve aumento significante quanto à locomoção total. No plus maze, analisando o tempo de latência, não revelou qualquer diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados com RB comparados ao controle. Quando tratados cronicamente com EtOH, o uso simultâneo de RB e DZC mostrou que a associação dessas drogas teve maior repercussão na locomoção do que uso isolado das mesmas. Esses resultados reforçam a hipótese de que os sistemas canabinóide endógeno e opióide possam estar envolvidos no processo de aprendizado e memória assim como na interferência no comportamento exploratório durante o uso agudo ou crônico do etanol.

PALAVRAS CHAVES: Etanol, canabinóides, opióides, plus maze, open field.

¹Faculdade de Medicina Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará 1200, Bloco 2U - Campus Umuarama, 38405-320, Uberlândia – MG, Brasil, nubiarodrigues@msn.com – Bolsista CNPq.

²Faculdade de Medicina Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará 1200, Bloco 2U - Campus Umuarama, 38405-320, Uberlândia – MG, Brasil .

³Instituto de Ciências Biomédicas. Professora Adjunta da Área de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Uberlândia. Av Pará 1720, Bloco 2A Sala 143 - Campus Umuarama, CEP 38400-920, Uberlândia – MG, brsantos@icbim.ufu.br.

ABSTRACT

Recent studies on the neurobiological basis of alcoholism suggest that the endocannabinoid system can acting an important role in the induced behavior of ethanol, influencing in the processes of extinguishing of the learned behaviors and acquisition memory. The aim of this present study was to evaluate the exploration behavior, memory and learning in mice, being used open field and plus maze, after chronic and sub chronic ethanol- treatment-EtOH 15% v/v (2,2mg/Kg)-and/or administration of antagonist endocannabinoid (Rimonabant (RB) 3mg/kg), antagonist NMDA (Dizocilpine (DZC); 0,3mg/kg) and/or opioid antagonist (Naloxone-Nlx-5mg/kg) and opioid agonist Morphine (Mor; 5mg/Kg). The significant increase in spontaneous locomotor response ethanol-treated acutely animals and with co-administration opioid and cannabinoid antagonists was observed. However sub and chronically treatment with RB haven't any significant increase in amount locomotor response. In plus maze, analyzing the latency time, there isn't any difference significant among the groups RB-treated and saline group. Ethanol- treated chronically EtOH and simultaneous administration of RB and DZC showed that the association of these drugs had greater repercussion in the locomotor activity comparing the isolated use oh these drugs .These results reinforce the hypothesis that cannabinoid endogenous and opioid systems can be involved in the learning process and memory as well as has interference in the exploration behavior during the acute or chronic ethanol treatment.

KEYWORDS: Ethanol, cannabinoids, opioids, plus maze, open field.

1. INTRODUÇÃO

Alcoolismo é considerado uma doença crônica, progressiva e frequentemente letal; é um dos maiores problemas de saúde pública não só por causar enormes danos à saúde e à qualidade de vida como também por deteriorar o bem-estar da família (GIANOULAKIS, 2001). O abuso e dependência de álcool, uma droga lícita, estão associados aos altos custos de saúde e aos problemas sócio-econômicos, incluindo baixa produtividade, problemas criminais, violências domésticas, aumento do número de acidentes de trânsito, baixa auto-estima, dificuldades no aprendizado e memória, efeito sobre a saúde mental entre outros (CASSWELL et al., 2009).

De acordo com George Koobs (2003), o alcoolismo pode ser definido como uma desordem comportamental complexa caracterizada pela preocupação com a obtenção de álcool e uma restrição de repertório comportamental em relação ao consumo excessivo e ao uso compulsivo, ou seja, perda do controle sobre o consumo. Sua característica é a ingestão excessiva, o desenvolvimento da tolerância e síndrome de abstinência, além do prejuízo social e funcionamento ocupacional (KOOBS et al., 2003).

Estudos recentes têm sugerido uma forte interação entre o sistema endocanabinoide e os comportamentos relacionados com a ingestão de etanol (HUNGUND et al., 2008). Esse sistema consiste de dois tipos de receptores, CB1 e CB2.

Os receptores CB1 estão entre os mais numerosos no cérebro e heterogeneamente distribuídos, estão concentrados no hipocampo (memória), cerebelo (perda da coordenação motora), hipotálamo (controle do apetite), substância nigra, vias dopaminérgicas mesolímbicas associadas ao sistema de recompensa e áreas de associação do córtex cerebral (RANG et al, 2007; KATONA et al, 2006).

Os receptores CB2 estão localizados periféricamente e associados ao sistema imune (VINOD et al., 2006), a expressão da transcrição dos genes CB2 foi observada em baço, tonsilas, timo, mastócitos e células brancas sanguíneas (BERDYSHEV, 2000; MUNRO et al., 1993; SUIGIURA e WAKU, 2000; WILSON e NICOLL, 2001).

Em contraste com descrições prévias os receptores CB1 cerebrais predominam na localização pré-sináptica, imunorreatividade sugerem que a localização pós-sináptica é mais comum (GONG et al., 2006; ONAIVI et al., 2006). Receptores CB1 e CB2 são membros típicos da família de receptores acoplados a proteína G_i (ABOOD et al., 1996; PERTWEE et al., 1997; DePETROCELLIS et al., 2004), cujo mecanismo de transdução de sinais está ilustrado na figura 1.

Embora fatores genéticos e ambientais tenham sido mostrados de suma importância no desenvolvimento da dependência do álcool, os mecanismos responsáveis ainda não são totalmente conhecidos (HUNGUND et al., 2008).

De acordo com VINOD et al., (2008), a ativação dos receptores CB1 elevou marcadamente a preferência da ingestão de etanol em ratos e camundongos, confirmando dados obtidos por COLOMBO et al. (2002) que demonstraram que os efeitos reforçadores do etanol seriam mediante estímulo da via de receptores CB1.

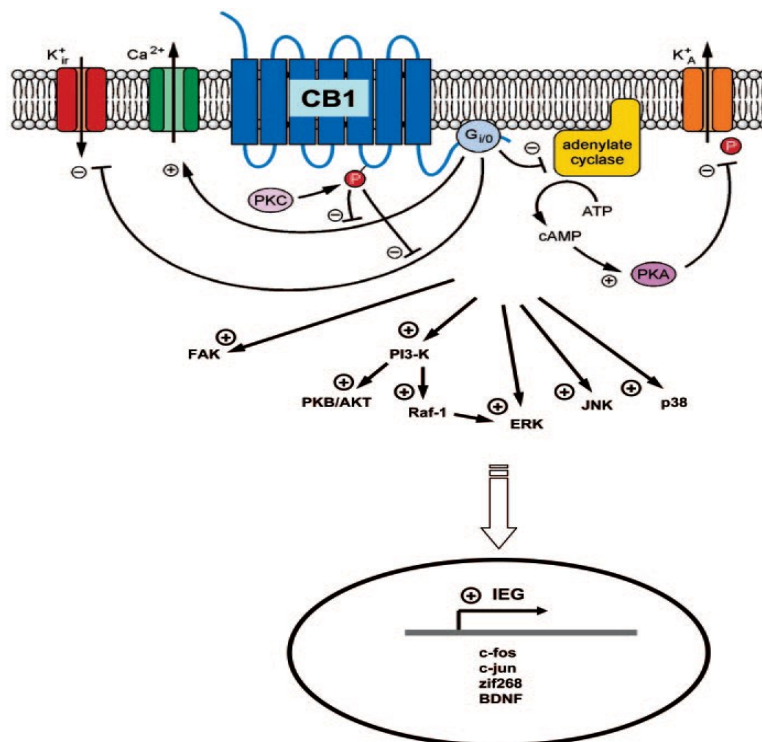


Figura 1 - Mecanismo de transdução do receptor CB1 – Pagotto et al.,(2006).

A severidade dos sintomas de abstinência está relacionada com o polimorfismo genético de CB1 (SCHMIDT et al., 2002). Recentes dados obtidos a partir da investigação da severidade das convulsões induzidas por manuseio após a deleção dos receptores CB1 em camundongos, apontaram para redução drástica das mesmas em *CB1-knockouts*. Esta observação corrobora com resultados obtidos através da utilização do antagonista Rimonabanti (RB) para o bloqueio de receptores CB1 (VINOD et al., 2008).

NIETO et al. (2001) constatou que o antagonista SR141716A (Rimonabanti) co-administrado com morfina (Mor) é capaz de abolir os efeitos de recompensa do alcalóide, quando utiliza o lugar de preferência condicionado (CPP) para diminuir a síndrome de abstinência precipitada pelo naloxona (Nlx). Esses resultados claramente demonstram a existência de interações entre os sistemas canabinóides e opióides na dependência de álcool, bem como nos efeitos comportamentais de substâncias de abuso.

Baseado na localização do receptor CB1 há estudos que indicam a capacidade destes em modificarem os processos sinápticos sobre os neurônios hipocámpais necessários para a memória de curto prazo.

Dados recentes sugerem que os endocanabidióis possam ter maior influência nos processos de extinção dos comportamentos aprendidos do que nos processos de aquisição da memória (DEADWYLER et al., 2007) e as substâncias que possam afetá-la têm sido alvo de constantes pesquisas após a identificação dos endocanabidióis.

Diversos estudos demonstraram o relacionamento entre o consumo do álcool e os sistemas centrais do opiáceo (HUNTER, BEAMAN et al., 1984; KIM, STROMBERG et al., 2000). Quando o estímulo aumenta a atividade do opiáceo realça o consumo de etanol, antagonistas do opiáceo reduzem a ingesta de etanol pelos ratos (HUNTER, BEAMAN et al 1984; REID e HUNTER et al., 1984; HUBBELL, CZIRR et al., 1986).

Existem três receptores de opióides, denominados μ , δ e κ , que medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opiáceos - figura 2. Todos os receptores opióides estão ligados através das proteínas G à inibição da adenilato ciclase. Além disso, facilitam a abertura de canais de potássio (hiperpolarização) e inibem a abertura dos canais de cálcio (inibindo a ação dos transmissores). Acredita-se que os receptores μ sejam responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides - alguns efeitos de euforia, sedação e dependência. Os receptores δ são provavelmente mais importantes na periferia. Os receptores κ contribuem para a analgesia a nível medular e pode induzir sedação e disforia.

Perspectivas genéticas dão conta que há evidências que genes de receptores μ e δ são potenciais candidatos moleculares para o fenótipo do alcoolismo (TOWN et al, 2000).

Antagonistas de receptores não seletivos são capazes de bloquear qualquer dos três subtipos de receptores opióides, μ , δ and κ , por exemplo, o Naloxona (Nlx).

O comportamento de dependência do etanol pode ser controlado, ou pelo menos modulado, por opiáceo endógenos desde que a ativação do sistema opiáceo pelo etanol reforce alguns de seus efeitos (GIANOULAKIS, 2004). Nos animais, observou-se a preferência pela ingesta de elevadas doses de etanol em ratos que possuíam grande densidade dos receptores opióides em determinadas estruturas límbicas relacionadas ao reforço positivo das propriedades das drogas de abuso quando comparados àqueles que preferiam baixas doses de etanol (McBRIDE e LI 1998).

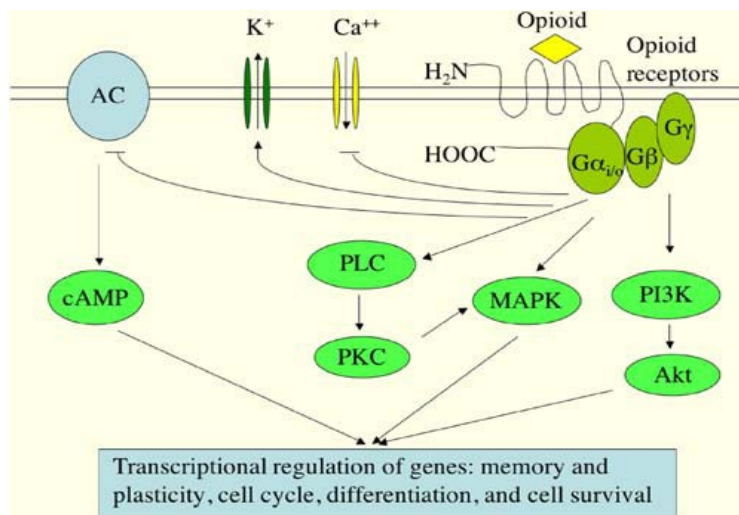


Figura 2 - início da regulação de transcrição na sinalização da ativação do receptor opióide. *J Neuroimmune Pharmacol* (2006) 1: 271

O etanol atua como um antagonista dos receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato), um receptor do tipo excitatório do SNC. Para ser ativado, o receptor NMDA necessita que ocorram dois fenômenos simultâneos. Primeiro deve ocorrer uma despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem - dependente, a despolarização através do glutamato permite a entrada de íons sódio (K^+) na célula e a saída do magnésio (Mg^{2+}) do canal por diferença de potencial. Concomitante a isso é necessária à ligação da glicina e do glutamato para a ativação do receptor. Após a saída do íon magnésio e a mudança conformacional gerada pela ligação dos agonistas, há um elevado influxo de cálcio (Ca^{2+}) pelo receptor (MACDERMOTT et al., 1986), além da entrada de sódio (Na^+) e saída de potássio em menor proporção (Figura 3).

O aumento nos níveis intracelulares de cálcio leva inúmeros eventos na célula; permite, entre outras ações, remodelagem do citoesqueleto, a ativação de proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} e aumenta a liberação de neurotransmissores, estando por isso relacionado com a potenciação de longa duração (LTP), aprendizado e plasticidade neural (COLLINGRIDGE & BLISS, 1987; OLNEY, 1989; WOOD ET AL., 1990; SCATTON, 1993).

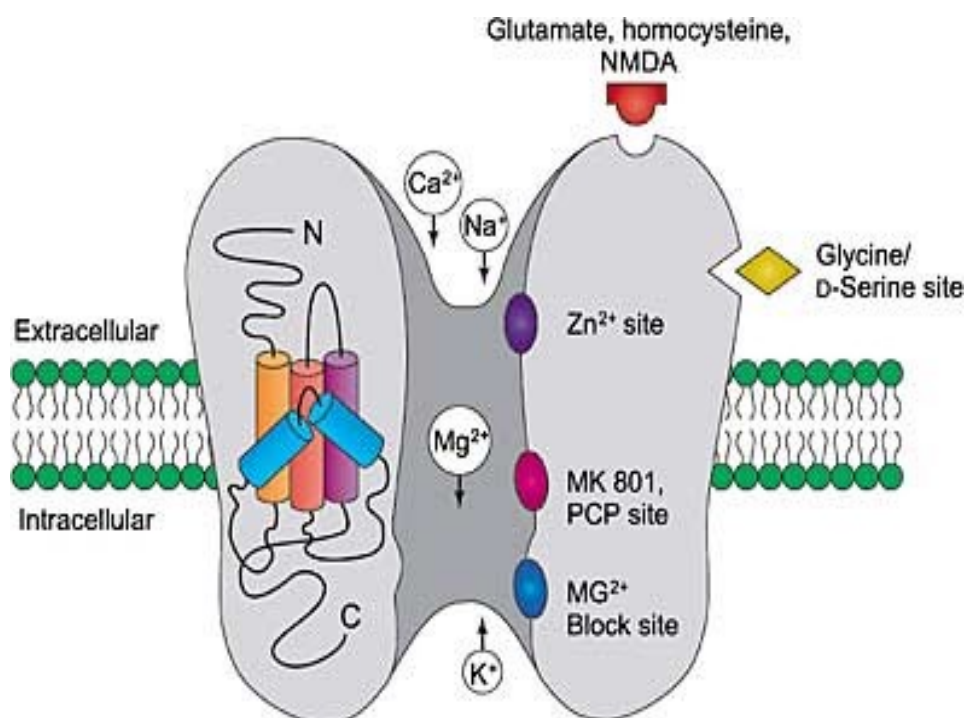


Figura 3: Representação receptor NMDA- http://www.uc.cl/sw_educ/neurociencias acesso em 23/08/2009.

Determinadas drogas são antagonistas seletivos dos canais operados por NMDA, como, por exemplo, a Dizocilpina (DZC), diminuem o influxo de cálcio para o interior das células reduzindo a excitabilidade sináptica.

Assim, este projeto teve como objetivo principal avaliar o comportamento geral exploratório, memória, aprendizado e o processo de bloqueio do apetite em camundongos após administração de antagonistas de receptores canabinóides endógenos e/ou antagonistas opióides, previamente tratados crônica e subcronicamente com etanol.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizados camundongos Swiss com 3 meses de idade. Ao chegarem ao laboratório os animais passaram por um período de adaptação ambiental, foram alojados em gaiolas plásticas, N= 6-8 animais. Durante todos os experimentos os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), respeitando-se o ritmo circadiano claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas), com fornecimento de alimento e água “ad libitum” até 30 minutos que antecederiam os

experimentos. As gaiolas e bebedouros foram lavados e esterilizados com água sanitária semanalmente, bem como a maravalha trocada a cada dois dias, para evitar crescimento de microorganismos que possam ameaçar a saúde dos animais ou mesmo alterar os resultados dos experimentos. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/ UFU) e do “*Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA*”.

2.2 Drogas

Nos experimentos realizados foram administrados Rimonabanti (antagonista CB1) gentilmente cedido por Pharmus - farmácia de manipulação, Etanol 99% (Vetec Química Fina LTDA) dissolvido em salina a 15%, Cloridrato de Naloxona – NARCAN[®] (Cristália 0,4mg/ml) antagonista de receptor opióide não seletivo, Sulfato de Morfina – DIMORF SP[®] (Cristália 1mg/ml) e Dizocilpina (inibidor NMDA) gentilmente cedido pela Dr^a. Rosana Camarini da Universidade de São Paulo – USP. Nlx, Mor e EtOH foram diluídos com solução salina, DZC e o RB foram diluídos com Twin 10, todas foram administradas via intraperitoneal nos animais. Utilizou-se RB 3mg/kg, Nlx 5 mg/kg, Mor 5 mg/kg, DZC 0,3mg/kg, EtOH 15% 1mg/kg. Administrou-se também via intraperitoneal salina 0,9% (1mg/kg) para o controle negativo.

2.3 Aparatos

2.3.1 *Open-Field* ou Campo-aberto (FRUSSA-FILHO, 2004):

A arena do campo-aberto destina-se a quantificar a atividade locomotora espontânea geral. O aparato trata-se de uma base circular de madeira (40 cm de diâmetro) envolta de uma parede circular de madeira com 50 cm de altura, sendo o topo aberto. O chão da arena está dividido em 25 quadrados.

Para o registro de locomoção foi utilizado contador manual (número de entrada do animal com as quatro patas em qualquer um dos quadrados), locomoção periférica (número de entradas com as quatro patas nos quadrados próximos à parede do aparato), locomoção central (número de entradas com as quatro patas em qualquer unidade distante da parede do aparato),

Rearing” (número de vezes que o camundongo levanta-se sobre as patas traseiras, ficando perpendicular ao solo), frequência e paradas serão medidas para quantificar a duração da imobilidade e “grooming” (segundos gasto para limpar-se). Todos esses parâmetros foram contabilizados após colocação do camundongo no quadrante central do aparato, observados durante 05 minutos.

2.3.2 *Plus-Maze* ou Labirinto em Cruz Elevado Discriminativo (SILVA and FRUSSA-FILHO 2000).

O aparato empregado, labirinto em cruz elevado modificado, foi feito de madeira, contendo dois braços fechados com paredes laterais e no topo (28,5 x 7 x 14 cm, 50 cm do nível chão) e dois braços abertos com as mesmas medidas.

A temperatura em todos os braços era a mesma da sala de experimentação. Para o treino, o animal foi colocado no centro do aparato e durante 10 minutos (duas sessões de 5 minutos) registrava-se a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços fechado e aberto, bem como o tempo de latência para entrada em um dos braços abertos.

Os animais foram observados em dois momentos. O primeiro momento reflete o comportamento de aquisição/aprendizado e o segundo momento reflete a retenção da informação ou memória.

2.4 Protocolo experimental

Experimentos I – Etanol agudo: os animais receberam SS 0,9%, SE, SE+Nlx, SE+Mor, SE+RB. Após 15 minutos eram submetidos aos teste de Campo-aberto. Cada grupo era composto por 8 animais (N=8).

Experimentos II – Etanol crônico: os animais receberam SS e SE durante 10 dias. No décimo dia, os animais que receberam SE cronicamente foram randomicamente distribuídos em grupos (N=8): SE+DZC SE+DZC+RB receberam soluções. Após 15 minutos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto por 5 minutos.

Experimento III – Rimonabanti: Os animais receberam SS 0,9%, RB durante 7 dias (RB7) e RB por 14 dias (RB14). Após 15 minutos foram submetidos a testes de campo aberto

(nos sétimo e décimo quarto dias) e de *plus-maze* em duas etapas. Etapa A: 15 minutos após administração da droga e etapa B: os mesmos animais 30 minutos após a etapa A.

Experimento IV – Labirinto em cruz-elevado: grupo de animais controle (solução salina 0,9%; N=8), grupo de animais que receberam RB por 7 e 14 dias (RB7, RB14; 3 mg/kg; N=8). Após 15 minutos da administração das substâncias nos sétimo e décimo quarto dias, a latência de transferência para um dos braços fechados era registrada. A retenção do aprendizado foi examinada após 30 minutos.

2.5 Análise estatística

Para análise dos dados dos experimentos comportamentais, foi utilizado o método ANOVA de uma via, seguido dos testes de Dunnett t-test e Fisher. O valor de P menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes para todas as comparações efetuadas.

3- RESULTADOS

3.1 Experimento I: Efeito do envolvimento dos sistemas opióide e canabinóide sobre o comportamento de camundongos agudamente tratados com EtOH. O teste de ANOVA de uma via demonstrou o efeito significativo da administração de álcool agudo sobre a atividade locomotora dos camundongos. Os animais que receberam EtOH, Mor, Nlx e RB, agudamente, apresentaram maior frequência na locomoção geral do que o respectivo grupo controle (Figura 4).

3.2 Experimento II: Efeito do envolvimento dos sistemas canabinóide e glutamatérgico (NMDA) na atividade locomotora de animais tratados cronicamente com etanol (10 dias). Após 15 minutos da última administração de etanol (2,2 mg/kg), os animais foram desafiados com DZC (0,3 mg/kg) ou DZC+ RB e após 15 minutos a frequência locomotora foi quantificada durante cinco minutos em campo aberto. Os valores são reportados como Média±SE, figura 5.

3.3 Experimento III: com a observação de que o Rimonabanto (agudamente; 3,0 mg/kg) exercia efeito sobre a atividade locomotora dos animais tratados, aguda e cronicamente, com etanol (2,2 mg/kg), resolvemos averiguar as atividades locomotora, após o bloqueio isolado do receptor CB1. ANOVA de uma via não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa na atividade motora entre os grupos tratados com RB (3mg/kg) durante um período de 7 dias (subcrônico; RB7) e 14 dias (crônico; RB14), e solução salina (Figura 6). Os valores são reportados como Média±SE (N=8/grupo).

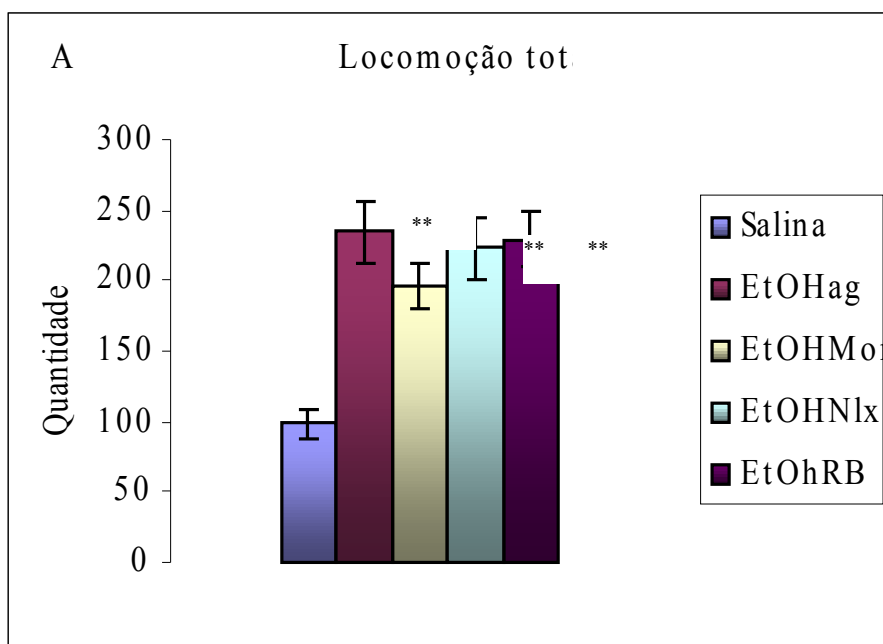


Figura 4. Atividade locomotora dos animais tratados com EtOH, Mor, NIx e RB, comparados com grupo controle(Crtl) solução salina: EtOHag (2,2mg/kg de etanol agudo), EtOHMor (etanol agudo e morfina 5 mg/kg), EtOHNIx (etanol agudo e naloxona 5 mg/kg) e EtOHRB (etanol agudo e rimonabanto 3,0 mg/kg). Anova de uma via, seguida de teste de Fisher. Os valores são reportados como Média±SE. * Difere do grupo controle tratado com solução salina. * P<0,001 e **P< 0,0001. Gráfico organizado por: BATISTA, N.R. 2009.

3.4 Experimento IV: Efeito comportamental de aprendizado e memória no tratamento com Rimonabanto subcrônico e crônico em camundongos.

A análise com ANOVA de uma via não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa no comportamento de aprendizado e memória entre os grupos tratados com RB (3mg/kg) durante um período de 7 dias (subcrônico; RB7) e 14 dias (crônico; RB14), e

solução salina, avaliados pelo tempo de latência para que o animal entrasse em um dos braços fechados.

O tempo de latência para entrada em um dos braços fechados (TL) foi medido em duas etapas A e B. A primeira etapa, A, refletia o comportamento de aprendizado ou aquisição; a segunda etapa B refletia a retenção da informação ou memória.

A análise estatística (dados não mostrados) não revelou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com RB (RB7A, RB7B, RB14A ou RB14B) e quando comparados com seus respectivos controle.

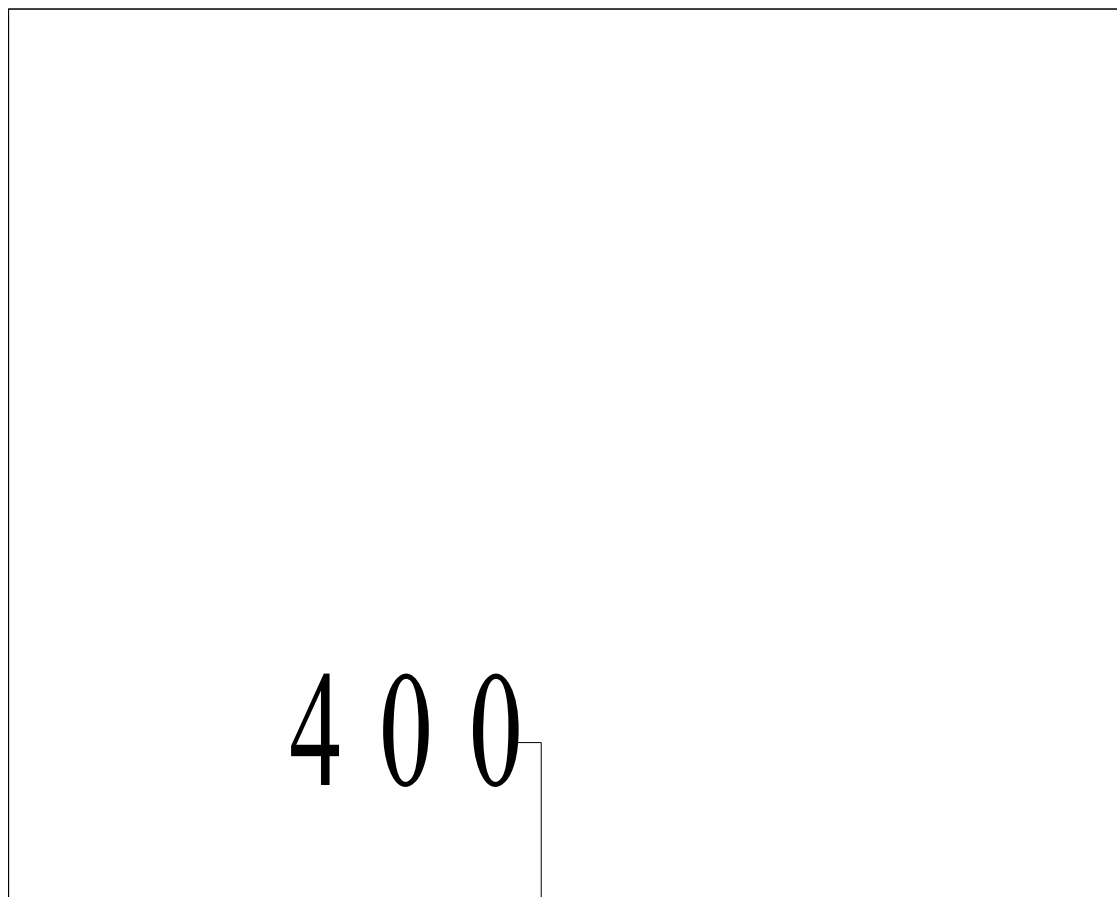


Figura 5. A administração de dizocilpina (DZC; 0,3mg/kg) aumentou significativamente a atividade locomotora dos camundongos que receberam solução etanólica durante o período de 10 dias. Essa atividade foi ainda exacerbada após o bloqueio do receptor canabinoide (Rb; 3,0 mg/kg) isolado ou associado à DZC. (N=8 por grupo). Gráfico organizado por: BATISTA, N.R. 2009. * Difere do grupo controle tratado com solução salina. ♦ Difere de EtOHcr +DZC. * P<0,05 e **P< 0,001.

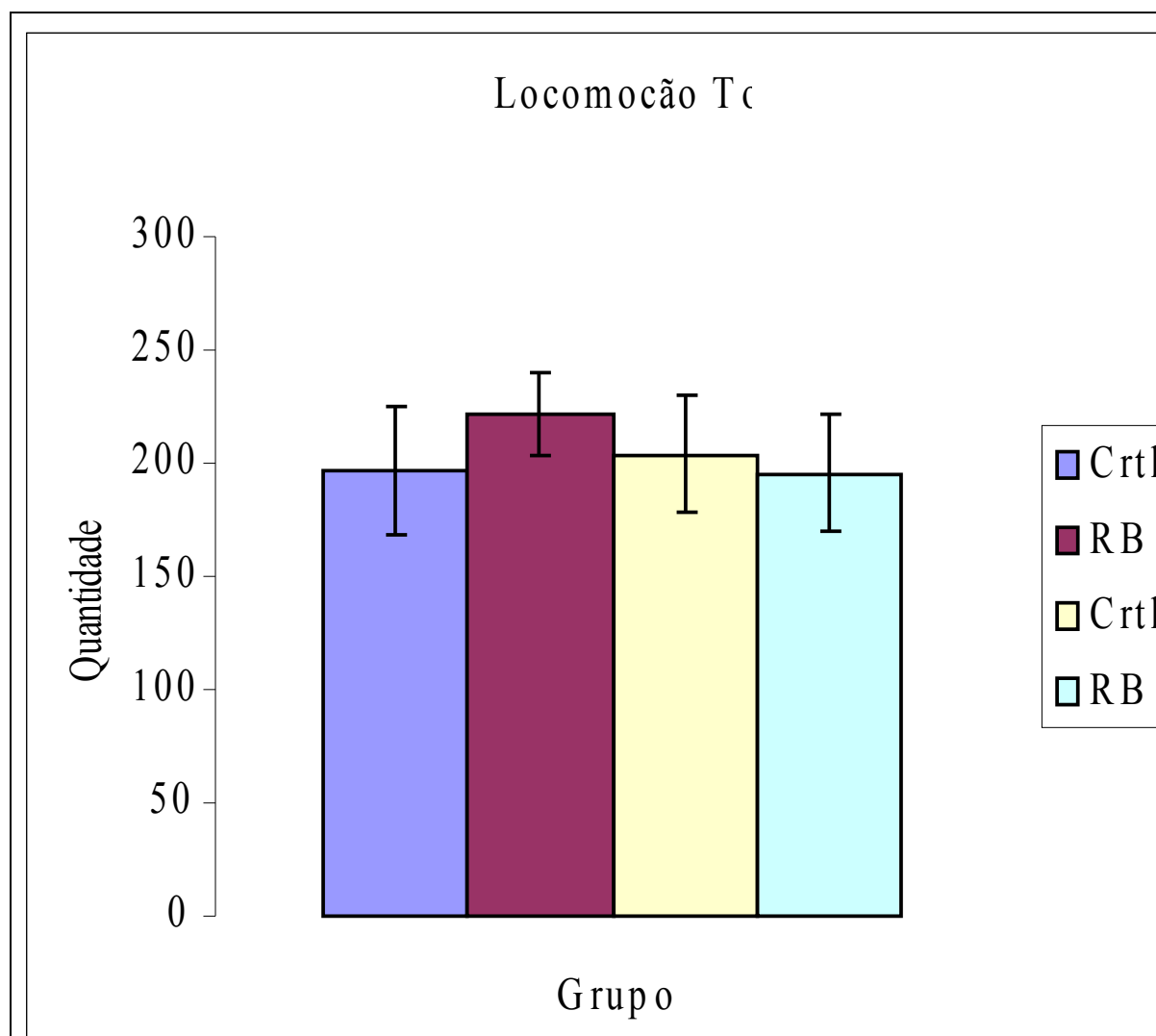


Figura 6. Atividade locomotora em camundongos que receberam RB (7 e 14 dias; 3 mg/kg). Gráfico organizado por: BATISTA, N.R. 2009.

5. DISCUSSÃO

Alcoolismo é considerado uma doença crônica, progressiva e frequentemente letal; é um dos maiores problemas de saúde pública não só por causar enormes danos à saúde e à qualidade de vida como também por deteriorar o bem-estar da família (GIANOULAKIS, 2001).

O efeito do álcool sobre a saúde caracteriza - se por ser complexo e multidimensional, estando seu consumo amplamente estendido e culturalmente aceito na maioria dos países ocidentais (ERDOZAIN et al., 2009).

O uso de álcool entre adolescentes tem crescido muito nas últimas décadas. O hábito de beber tem se tornado parte da cultura dos jovens ocidentais e a exceção tem sido a total abstinência entre os adolescentes. Pesquisas de âmbito nacionais e estrangeiras apontam que no final do colegial cerca de 60-90% dos adolescentes consumiram algum tipo de bebida alcoólica, ficaram embriagados e tiveram ressaca.

O consumo de álcool entre os mais jovens está relacionado complicações agudas graves tais como aumento de acidentes graves, violência, direção perigosa e sexo sem proteção (VIERA et al 2007).

O álcool afeta quase todos os sistemas neuroquímicos (sistemas GABAérgicos, Glutamatérgicos, Opioidérgicos, Dopaminérgicos, Noradrenérgicos).

Amplas evidências implicam a neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica como chaves importantes tanto para ações agudas (dose única) e crônicas (doses repetidas) do álcool. As ações ansiolíticas, anticonvulsivantes, hipnóticas-sedativas são mediadas, pelo menos em parte, por esses dois sistemas.

A ingestão crônica (acima de 7 dias) resulta em tolerância aos efeitos comportamentais e dependência do álcool. As adaptações dos receptores de GABA_A e Glutamato (NMDA) são os principais fatores responsáveis pela tolerância e dependência (GRANT E LOVINGER, 1995).

A dizocilpina, um potente antagonista não-competitivo do receptor NMDA, tem sido reportada como protetora contra as convulsões desencadeadas pela síndrome de abstinência em camundongos machos (GRANT et al., 1992), embora (DEVAUD et al. 2002) tenha demonstrado que a dizocilpina aumenta significativamente o limiar convulsivo de ratas fêmeas que dos machos.

Em nosso estudo a administração aguda de dizocilpina (DZC), isolada ou associada ao RB, promoveu um significativo aumento da atividade locomotora.

Neste estudo observamos um aumento de aproximadamente 60% na locomoção total dos animais cronicamente tratados com etanol e que receberam DZC isoladamente. Esses achados estão em acordo com os resultados previamente demonstrados por outros investigadores (DEVEAU et al., 2002).

Um maior aumento na atividade locomotora ocorreu após a administração de dose única de DZC seguida de dose única de RB, bloqueador dos receptores canabinóides CB1,

PANLILIO et al., 2008, descreveu em seus experimentos que a administração de 10 mg/kg de Anadamida, agonista do receptor CB1 causou depressão generalizada da atividade locomotora. Este dado confirma a estimulação da atividade em nossa atividade pelo uso do RB.

A administração aguda de etanol mostrou claramente o efeito estimulante da primeira fase do álcool com o aumento da atividade locomotora nos diferentes grupos estudados. Este efeito está associado às ações gabaérgicas (inibindo a inibição central) e aumento da liberação de dopamina nas áreas reforçadoras (núcleo accumbens e área tegmental ventral).

Os resultados do presente estudo mostram um aumento da atividade locomotora tanto no grupo tratado com morfina como no grupo tratado com seu oponente, o Naltrexona.

Estudos prévios demonstraram que o Naltrexona, embora antagonize efeitos reforçadores do álcool, é capaz de modular bidirecionalmente o aumento da atividade locomotora após a administração moderada de etanol (2,5 mg/kg) (SANCHIS-SEGURA et al., 2004). Isso explicaria o fato de observarmos aumento de atividade em ambas as situações. Assim, parece que a capacidade do Naltrexona modificar a locomoção induzida pelo etanol, ou outros efeitos comportamentais do álcool depende do esquema de administração.

Quando testamos o envolvimento do sistema endocanabinóide nos diferentes comportamentos, ficamos surpresos por não observarmos efeitos estatisticamente significantes.

Estudos têm mostrado que os agonistas de receptores canabinóides muitas vezes inibem a locomoção espontânea e induzem a catalepsia, ou produzem efeitos bifásicos na atividade locomotora (SAÑUDO-PEÑA et al., 2000). Assim, nossos resultados estão de acordo com o descrito na ampla literatura.

6. CONCLUSÃO

Embora estes experimentos sejam preliminares de uma sequência de outros eventos, eles nos remetem de que ainda temos que aprofundar nossos estudos de forma a poder contribuir para ampliação do conhecimento sobre os efeitos e implicações dos receptores canabinóides e drogas que possam auxiliar nas diferentes dependências químicas envolvidas neste sistema.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem PIBIC/CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica ao primeiro autor. Projeto nº. B-002/2008.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, M. E.; MARTIN, B. R. (1996). "Molecular neurobiology of the cannabinoid receptor". *Int Rev Neurobiol* 39: 197-221.

BASAVARAJAPPA BS, HUNGUND BL. "Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidylethanolamine in SK-N-SH cells". *J Neurochem.* 1999; 72(2):522-8.

BROWN AJ. "Novel cannabinoid receptors". *Br J Pharmacol*;152(5):567-75, 2007.

[CASSWELL S, THAMARANGSI T](#) "Reducing harm from alcohol: call to action". *Lancet.* Jun 27; 373(9682):2247-57, 2009.

CLAPP P., BHAVE S. V., HOFFMAN, P. L., "How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence" *Alcohol Research & Health* Vol. 31, No. 4, 310-339, 2008.

COLLINGRIDGE, G.L., BLISS, T.V. (1987). NMDA receptors: their role in long term potentiation. *Trends Neurosci.* 10, 288-293.

COLOMBO G, ORRU A, LAI P, CABRAS C, MACCIONI P, RUBIO M, GESSA GL, CARAI MA. 2007. "The cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant, as a promising pharmacotherapy for alcohol dependence: Preclinical evidence". *Mol Neurobiol* 36:102–112.

COLOMBO G, SERRA S, BRUNETTI G, GÓMEZ R, MELIS S, VACCA G, et al., "Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring in rats". *Psychopharmacology (Berl)*;159(2):181-7, 2002.

DA SILVA GE, MORATO GS, TAKAHASHI RN. "Rapid tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between ethanol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice". *Eur J Pharmacol.* 2001;431(2):201-7.

DEADWYLER, S. A. AND R. E. HAMPSON (2008). "Endocannabinoids modulate encoding of sequential memory in the rat hippocampus." *Psychopharmacology (Berl)*.

DE PETROCELLIS, L., CASCIO M. G., et al. "The endocannabinoid system: a general view and latest additions." *Br J Pharmacology* 141 (5): 765-74, 2004.

DEVAUD, L. L., BARTOO, G., MALTHANKAR, G.; "Altered responses to dizocilpine maleate administration in ethanol-withdrawn male and female rats" *Alcohol* 28, 83-93, 2002

DEWEY WL. "Cannabinoid pharmacology." *Pharmacol Rev.*;38(2):151-78, 1986.

DEVAUD, L. L., MATTHEWS, D. B., & MORROW, A. L. (1999). "Gender impacts behavioral and neurochemical adaptations in ethanol-dependent rats." *Pharmacol Biochem Behav* 64, 841-849.

DEVAUD, L. L., & MORROW, A. L. (1999). "Gender-selective effects of ethanol dependence on NMDA receptor subunit expression in cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus." *Eur J Pharmacol* 369, 331-334.

DE WITTE P, PINTO E, ANSSEAU M, VERBANCK P. 2003. "Alcohol and withdrawal: From animal research to clinical issues". *Neurosci Biobehav Rev* 27:189-197.

DI MARZO V, BREIVOGEL CS, TAO Q, BRIDGEN DT, RAZDAN RK, ZIMMER AM, et al. "Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain." *J Neurochem*,75(6):2434-44, 2000.

ERDOZAIN, A.M., MEANA J.J. AND CALLADO L.F. "Implicación del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo" *Trastornos adictivos*;11(2): 85-95, 2009.

FELDER, C.C., NIELSEN A., BRILEY E.M., PALKOVITS M., PRILLER J., AXELROD J., NGUYEN D.N., RICHARDSON J.M., RIGGIN R.M., KOPPEL G.A. "Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat". *FEBS Lett.* 393: 231-235, 1996.

GEORGE SR, FAN T, NG GY, JUNG SY, O'DOWD BF, NARANJO CA. 1995. "Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: Reversal by increasing synaptic dopamine." *J Pharmacol Exp Ther* 273:373-379.

GESSA GL, MELIS M, MUNTONI AL, DIANA M. 1998. "Cannabinoids activate mesolimbic dopamine neurons by an action on cannabinoid CB1 receptors." *Eur J Pharmacol* 341:39 - 44.

GIANOULAKIS, C. (2004). "Endogenous opioids and addiction to alcohol and other drugs of abuse." *Curr Top Med Chem* 4(1): 39-50.

GIANOULAKIS C. "Endogenous opioids and excessive alcohol consumption." *J Psychiatry Neurosci.*;18(4):148-56, 1993.

GIANOULAKIS C., "Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism" *J Psychiatry Neurosci*; 26(4):304-18, 2001.

GRANT, K.A., LOVINGER D.M. "Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: receptor-mediated neuronal processes" *Clin Neurosci.*;3(3):155-64, 1995.

HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, et al. "Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A*;87(5):1932-6, . 1990.

HUBBELL, C. L., S. A. CZIRR, et al. (1986). "Consumption of ethanol solution is potentiated by morphine and attenuated by naloxone persistently across repeated daily administrations." *Alcohol* 3(1): 39-54.

HUNTER, G. A., C. M. BEAMAN, et al. (1984). "Selected opioids, ethanol and intake of ethanol." *Alcohol* 1(1): 43-6.

IZQUIERDO, I. AND MEDINA J. H. "Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures." *Neurobiol Learn Mem* 68(3): 285-316, 1997.

KATONA, I.; URBAN G. M., et al. "Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses." *J Neurosci* 26(21): 5628-37, 2006.

KIM, S-G., STROMBERG, M. F., KIM, M-J., VOLPICELLI, J. R., PARK, J-M. (2000). The effect of antagonists selective for μ and a δ -opioid receptor subtypes on alcohol consumption in C57BL/6 mice. *Alcohol* 22, 85-90.

KOOB ,G. F. ;"Alcoholism: Allostasis and Beyond" *Alcohol Clin Exp Res*, Vol 27, No 2,; pp 232–243, 2003.

KOOB GF. 2000. "Animal models of craving for ethanol". *Addiction* 95(Suppl. 2):s73–81

KOOB GF." The neurobiology of self-regulation failure in addiction: an allostatic view." *Neuro-Psychoanal.* 5:35–39, 2003.

LOVINGER,D. M; "Communication Networks in the Brain :Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol", *Alcohol Research & Health*, 1995.

MACDERMOTT, A.B., MAYER, M.L., WESTBROOK, G.L, SMITH, S.J., BARKER J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmatic calcium concentration in cultured spinal cords neurones. *Nature.* 321, 519-522.

MCBRIDE, W. J. AND T. K. LI (1998). "Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents." *Crit Rev Neurobiol* 12(4): 339-69.

MAS-NIETO, M., POMMIER, B., TZAVARA, E. T., CANEPARO, A., NASCIMENTO, S., FUR, G. L., ROQUES, B. P., AND NOBLE, F.; "Reduction of opioid dependence by the CB₁ antagonist SR141716A in mice: evaluation of the interest in pharmacotherapy of opioid addiction" *Br J Pharmacol.*; 132(8): 1809–1816., 2001 April.

OLNEY, J. W. (1989). Excitotoxicity and N-Methyl-D-Aspartate receptors. *Drug Dev. Res.* 17, 299-319.

PAGOTTO U., MARSICANO G., COTA D., LUTZ B., Pasquali R. "The Emerging Role of the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance" *Endocr Rev.* Feb;27(1):73-100 , 2006.

PANLILIO L. V., MAZZOLA C., MEDALIE, J., HAHN, B., JUSTINOVA, Z., DRAGO, F., CADET, J. L., YASAR, S., GOLDBERG, S. R. "Anandamide-induced behavioral disruption through a vanilloid-dependent mechanism in rats" *Psychopharmacology* 203:529–538, 2009.

PERTWEE R. G. "Cannabinoid pharmacology: the first 66 years." *Br J Pharmacol.*; 147 Suppl 1:S163-71, 2006.

PERTWEE, R. G. "Comprehensive review of properties of cannabinoid receptors and their ligands." *Pharmacology Ther* 74: 129- 180 , 1997.

PERTWEE R. G. "Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors." *Pharmacol Ther.*; 74(2):129-80, 1997.

PIOMELLI D. "The molecular logic of endocannabinoid signalling." *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(11):873-84.

PISTIS M, PERRA S, PILLLOLA G, MELIS M, GESSA GL, MUNTONI AL. "Cannabinoids modulate neuronal firing in the rat basolateral amygdala: evidence for CB₁- and non-CB₁-mediated actions. *Neuropharmacology*; 46(1):115-25, . 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTLER, J. M. "Dependência e drogas de abuso. *Farmacologia*", v. único, 2007, 515 – 531p.

REID, L. D. AND G. A. HUNTER (1984). "Morphine and naloxone modulate intake of ethanol." *Alcohol* 1(1): 33-7.

SCATTON, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 7, 389-400.

SANCHIS-SEGURA ,C., PASTOR, R. AND ARAGON, C. M. G. “Opposite effects of acute versus chronic naltrexone administration on ethanol-induced locomotion “ Behavioural Brain Research Volume 153, Issue 1, Pages 61-67 , 12 August 2004.

SANNA PP, SIMPSON C, LUTJENS R, KOOB G. “ERK regulation in chronic ethanol exposure and withdrawal”. Brain Res.; 948 (1-2):186-91, 2002.

SAÑUDO-PEÑA MC, ROMERO,J., SEALE, G. E., FERNANDEZ-RUIZ J.J., WALKER, J. M., “Activational role of cannabinoids on movement” European Journal of Pharmacology, Volume 391, Issue 3, Pages 269-274, 17 March 2000.

SAÑUDO-PEÑA MC, TSOU K, DELAY ER, HOHMAN AG, FORCE M, WALKER M “Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat”. Neurosci Lett 223:125 – 128, 1997.

SCHMIDT LG, SAMOCHOWIEC J, FINCKH U, FISZER-PIOSIK E, HORODNICKI J, WENDEL B, et al. “Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1)polymorphism with severe alcohol dependence”. Drug Alcohol Depend.;65 (3):221-4, 2002.

SHRAGER, Y., BAYLEY P. J., et al. "Spatial memory and the human hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A 104(8): 2961-6, 2007.

SILVA, R. H. AND FRUSSA-FILHO R. "The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine." J Neurosci Methods 102(2): 117-25, 2000.

STUBBS CD, SLATER SJ. “Ethanol and protein kinase C.” Alcohol Clin Exp Res.;23(9):1552-60, 1999.

TOWN, T., SCHINKA, J., TAN, T., MULLAN, M. (2000). The opioid receptor system and alcoholism: a genetic perspective. European Journal of Pharmacology 410, 243-248.

VACCARINO, A. L. & KASTIN, A. J. (2000). Endogenous opiates: 1999. Peptides 21, 1975 - 2034.

VALDEZ GR, ROBERTS AJ, CHAN K, DAVIS H, BRENNAN M, et al. 2002. “Increased ethanol selfadministration and anxiety-like behavior during acute withdrawal and protracted abstinence: regulation by corticotropin-releasing factor.” Alcohol Clin. Exp. Res. 26:1494–501.

VELARDO, M. J., SIMPSON, V. J., & ZAHNISER, N. R. (1998). “Differences in NMDA receptor antagonist-induced locomotor activity and [3H]MK-801 binding sites in short-sleep and long-sleep mice”. Alcohol Clin Exp Res 22, 1509–1515.

VIEIRA, D. L., RIBEIRO, M.;ROMANO, M.; LARANJEIRA, R. R., “Álcool e adolescentes: estudo para implementar políticas municipais”. Rev. Saúde Pública , São Paulo, v. 41, n. 3, 2007 .

VINOD K.Y., YALAMANCHILI , R., THANOS, P.K,VADASZ C., COOPER, T. B., VOLKOW, N. D., HUNGUND B. L. “Genetic and Pharmacological Manipulations of the CB1 Receptor Alter Ethanol Preference and Dependence in Ethanol Preferring and Nonpreferring Mice”synapse ;62:574–581, 2008.

VINOD, K. Y., YALAMANCHILI R. , XIE S., COOPER , T. B., HUNGUND ,B. L. “Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system” ; Neurochemistry International 49 619–625, 2006.

WOOD, P.L., RAO, T.S., IYENGAR, S., LANTHORM, T., MONAHAN, J., CORDI, A., SUN, E., VAZQUEZ, M., GRAY, N., CONTRERAS, P. (1990). A review of the in vitro and in vivo neurochemical characterization of the NMDA/PCP/glycine/ion channel receptor macrocomplex. Neurochem. Res. V.15, 217-230.

YULONG L. CHEN, PING-YEE LAW, HORACE H. LOH . Nuclear *factor* κ B signaling in opioid functions and receptor gene expression. Journal Neuroimmune Pharmacology (2006) 1: 270–279.