

GEORGE ERNESTO DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO Δ^9 -TETRAHIDROCANABINOL
SOBRE A APRENDIZAGEM/MEMÓRIA E
TOLERÂNCIA AVALIADAS EM
CAMUNDONGOS NO LABIRINTO AQUÁTICO E
TESTE DO ROTA- ROD**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-graduação em Farmacologia,
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

FLORIANÓPOLIS

2000

Silva, George E. Influência do Δ^9 -tetrahydrocannabinol sobre aprendizagem/memória e tolerância avaliadas em camundongos no labirinto aquático e teste do rota-rod. Florianópolis, 2000. 75 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Dr. Reinaldo N. Takahashi

Defesa: 11/02/2000.

Conhecendo-se os efeitos do principal constituinte psicoativo da maconha, [Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)], sobre o aprendizado e memória, e a capacidade da droga em induzir tolerância, no presente estudo duas abordagens experimentais foram realizadas para examinar os efeitos do Δ^9 -THC em camundongos. Com a finalidade de verificar a ação do Δ^9 -THC sobre as diferentes etapas da memória e a memória operacional foi utilizado o modelo experimental [labirinto aquático de Morris (LAM)]. Para determinar se a droga poderia levar ao desenvolvimento de [tolerância rápida] e também tolerância rápida cruzada, foi utilizado o modelo do [rota-rod], que mede a incoordenação motora dos animais. Os experimentos demonstraram que dentre as etapas do processo de memória, aquisição, consolidação e evocação, a primeira é a única etapa que é afetada significativamente pelo Δ^9 -THC no LAM e esta ação é mediada pelo receptor canabinoide CB1, já que o antagonista [SR 141716A] reverteu o prejuízo. Neste mesmo modelo a memória operacional também parece ser dificultada. No experimento com o aparelho de "rota-rod" a tolerância rápida à incoordenação motora pelo Δ^9 -THC foi observada, assim como tolerância rápida cruzada, etanol/ Δ^9 -THC. O antagonista SR 141716A não foi capaz de bloquear a tolerância rápida sugerindo a possibilidade de que outro mecanismo possa estar envolvido, além dos receptores CB1. Os dois experimentos demonstraram pela primeira vez que o Δ^9 -THC prejudica o aprendizado em camundongos no labirinto aquático e que a tolerância rápida à incoordenação motora no aparelho de "rota-rod" também se desenvolve para esta droga.

[Δ^9 -THC] [Labirinto aquático de Morris] [rota-rod] [SR 141716A] [Tolerância rápida]

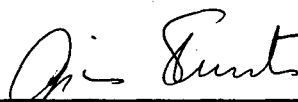
“INFLUÊNCIA DO Δ^9 -TETRAHIDROCANABINOL SOBRE A APRENDIZAGEM/MEMÓRIA E TOLERÂNCIA AVALIADAS EM CAMUNDONGOS NO LABIRINTO AQUÁTICO E TESTE DO ROTA-ROD”

POR

GEORGE ERNESTO DA SILVA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:


Banca Examinadora:



Gina Struffaldi Morato
(FMC/UFSC-Membro-Titular)



Sérgio Tufik
(UNIEESP/SP -Membro Titular)



Reinaldo Naoto Takahashi
(FMC/UFSC-Membro Titular)

e

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC

Florianópolis, 11 de Fevereiro de 2000.

A três mulheres maravilhosas

**Brunildes, mãe fonte de energia,
exemplo de força de vontade e coragem**

Catarina, tia que sempre apoiou-me incondicionalmente

Marcela, companheira e amiga.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Reinaldo, que com sabedoria e paciência soube guiar-me por esta caminhada científica.

A professora Dr. Gina, por todos os esclarecimentos e pela disponibilização do laboratório para completar este trabalho.

Ao professor Dr. Pádua, que desde as primeiras aulas de farmacologia, na graduação, demonstrou sempre disponibilidade para sanar as dúvidas, e neste momento, contribuiu também neste trabalho.

Ao companheiro de laboratório Rubens, que com sua experiência e dedicação soube auxiliar-me em todos os momentos.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, pelo cultivo da arte do saber, pela dedicação incansável, ensinando como trilhar o caminho do conhecimento.

A todos os colegas da turma Cláudia, Eunice, Fábio, Janice, Juliano, Marcia, Marcos, Rodrigo e Sandra, pela convivência em momentos de trabalho e de lazer. Também agradeço aos colegas da turma que receberam bolsas, e num ato de solidariedade me ajudaram financeiramente a sobreviver durante o mestrado.

Aos amigos jornalistas Gisiele, Gustavo e Marcela pela ajuda com a escrita, facilitando a expressão das idéias.

Aos colegas que já conquistaram esta etapa e aqueles que estão começando a caminhada e que de alguma forma prestaram ajuda quando precisei.

A todos os funcionários do departamento que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina que gentilmente doou Δ^9 -THC, objeto de estudo deste trabalho.

A SANOFI (França) pela doação do SR 141716A, ferramenta valiosa para o desenvolvimento do trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1-INTRODUÇÃO	1
1.1-MACONHA E RECEPTORES CANABINÓIDES.....	1
1.2-CANABINÓIDES PERSPECTIVAS E PROBLEMAS.....	4
1.3- Δ^9 -THC E MEMÓRIA.....	5
1.4-LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	9
1.5- Δ^9 -THC, TOLERÂNCIA E TOLERÂNCIA RÁPIDA.....	11
1.6- Δ^9 -THC E ETANOL.....	15
1.7- Δ^9 -THC, LABIRINTO AQUÁTICO E TOLERÂNCIA.....	16
2-OBJETIVOS	19
3- MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1-ANIMAIS.....	20
3.2-DROGAS.....	20
3.3-APARELHO E PROCEDIMENTO.....	21
3.3.1-TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO.....	21
3.3.2-TESTE DO ROTAROD.....	23
4-ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5-RESULTADOS	28
6-DISCUSSÃO	51
7-CONCLUSÕES	66
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIACES

ACD	Amostra complementar diferida
ACh	Acetilcolina
ANCD	Amostra não complementar diferida
ASDA	Alteraco serial direcionada ao alvo
Ca ²⁺	Cálcio
CB1	Receptor canabinóide
CB2	Receptor canabinóide
DE ₅₀	Dose efetiva necessária para obter 50% do efeito máximo
e.p.m.	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
i.p.	intraperitoneal
LAM	Labirinto Aquático de Morris
NMDA	N-metil-D-aspartato
PLP	Potenciao de longo prazo
SNC	Sistema Nervoso Central
SR141716A	N-(piperidina-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

LISTA DE FIGURAS	PÁG.
FIGURA 1- Desenho esquemático do labirinto aquático de Morris.....	21
FIGURA 2- Desenho esquemático do aparelho de rota-rod.....	24
FIGURA 3 - Efeito de diferentes doses de Δ^9 -THC sobre a aquisição da memória de referência espacial.....	29
FIGURA 4 - Influência do Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado de camundongos durante o aprendizado espacial.....	30
FIGURA 5 - Efeito do Δ^9 -THC, SR 141716A e combinação Δ^9 -THC + SR141716A sobre a aquisição da memória de referência espacial.....	32
FIGURA 6 - Influência do Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado dos camundongos sob efeito da droga.....	33
FIGURA 7 - Efeito do Δ^9 -THC sobre a consolidação da memória de referência espacial	34
FIGURA 8 - Influência do Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado dos camundongos, tratados 24 horas antes, logo após a sessão	36
FIGURA 9 - Efeito do Δ^9 -THC sobre a evocação da memória de referência espacial.....	37
FIGURA 10 - Influência do Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado dos camundongos, com administração da droga somente na sessão sete.....	38
FIGURA 11 - Ação do Δ^9 -THC sobre a memória operacional e sua influência na capacidade de nado.....	40
FIGURA 12 - Avaliação do efeito do Δ^9 -THC em diferentes doses, sobre a performance de camundongos no rota-rod.....	41
FIGURA 13 - Avaliação do efeito do antagonista SR 141716A em reverter o prejuízo na performance de camundongos no rota-rod.....	43
FIGURA 14 - Avaliação dos efeitos do Δ^9 -THC, SR 141716A e etanol, na performance dos camundongos, medido em diferentes intervalos de tempos, no rotarod.....	44
FIGURA 15 – Desenvolvimento de tolerância rápida e cruzada ao etanol/ Δ^9 -THC	46

FIGURA 16 – Desenvolvimento de tolerância rápida e cruzada ao Δ^9 -THC/etanol	47
FIGURA 17 – Influência do antagonista SR 141716A no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol.....	49
FIGURA 18 - Influência do antagonista SR 141716A no desenvolvimento de tolerância rápida ao Δ^9 -THC.....	50

LISTA DE TABELAS

PÁG.

TABELA 1 - Esquema de procedimento experimental no labirinto aquático de Morris. 22

TABELA 2 - Esquema de procedimento experimental no aparelho de rota-rod para verificar a tolerância rápida e tolerância cruzada. 25

TABELA 3 - Esquema de procedimento experimental para verificar a influência do antagonista SR 141716A na tolerância. 26

RESUMO

A maconha é a droga ilícita mais consumida no mundo, seu principal constituinte psicoativo é o Δ^9 -THC. Entre os vários efeitos da droga, o prejuízo na memória é um dos mais discutidos e estudados. Em animais, a droga já foi avaliada em vários modelos experimentais de aprendizado e memória. Tanto a nível de cognição, quanto em outros processos como analgesia, hipotermia, motricidade a droga tem demonstrado, após repetida exposição diminuir seu efeito, ou seja, levar ao desenvolvimento de tolerância. Um dos modelos experimentais mais estudados para avaliação de aprendizado e memória é o labirinto aquático de Morris, todavia o Δ^9 -THC foi muito pouco estudado neste modelo em camundongos. Por outro lado na maioria dos experimentos descrevendo tolerância os animais são expostos repetidamente a droga por longo período. Assim sendo, um tipo de tolerância muito pouco estudado é aquela que se desenvolve após uma segunda administração da droga 8-24 h depois da primeira, caracterizando a chamada tolerância rápida. Nosso objetivo então foi avaliar o efeito do Δ^9 -THC no LAM em camundongos e determinar sua ação em diferentes etapas do processo de memória e o efeito sobre a memória operacional. Em seguida, foi verificado o desenvolvimento de tolerância rápida à incoordenação motora produzida pelo Δ^9 -THC, bem como tolerância cruzada entre etanol e Δ^9 -THC utilizando o aparelho de "rota-rod". O envolvimento do receptor CB1 nestas respostas foi investigado utilizando o antagonista canabinóide SR 141716A. Os resultados obtidos indicam que o Δ^9 -THC (8 mg/kg, i.p.) afeta a etapa de aquisição da informação no labirinto aquático de Morris, não influenciando a consolidação e evocação da memória. A capacidade do Δ^9 -THC em prejudicar o desempenho dos animais durante a etapa de aquisição foi relacionada com a ação agonista do Δ^9 -THC sobre os receptores canabinóides CB1, já que o SR 141716A (1 mg/kg, i.p.) reverteu o prejuízo. Na avaliação da memória operacional o Δ^9 -THC também parece piorar o desempenho dos animais. No teste do "rota-rod", o Δ^9 -THC (28 mg/kg, i.p.) no dia 1, induziu prejuízo motor. Na segunda administração, dia 2, este efeito diminuiu indicando o fenômeno da tolerância rápida. O mesmo procedimento experimental foi realizado com etanol (2,25 g/kg, i.p.), confirmando resultados anteriores. O antagonista SR 141716A (2 mg/kg, i.p.) não reverteu o fenômeno, sugerindo a possibilidade do efeito do próprio antagonista ou do envolvimento de

outros mecanismos. A tolerância rápida cruzada se desenvolveu, porém apenas em um sentido, etanol/ Δ^9 -THC. Os resultados do presente estudo demonstraram pela primeira vez que o aprendizado espacial é prejudicado pelo Δ^9 -THC no labirinto aquático em camundongos, e que esse prejuízo pode ser mediado por receptores canabinóides centrais. A tolerância rápida se desenvolveu para o Δ^9 -THC no aparelho de “rota-rod”, indicando a possibilidade de abordagens mais rápidas e econômicas para o estudo de tolerância, principalmente para drogas de abuso.

ABSTRACT

Marijuana is one of the most widely used psychoactive drug in the world and Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC is its main active component. THC has been show to produce various pharmacological effects including analgesic, hypothermic, depressed motor activity and memory deficit. The cognitive effects of Δ^9 -THC have been reported in different experimental models. Further, repeated administration of THC has been shown to induce tolerance to various of these responses. To our knowledge a few studies have evaluated the effects of THC on memory as assessed in water maze in rodents. Therefore, a series of procedures were used in a Morris-type water maze to investigate the effect of Δ^9 -THC on learning/memory processes in mice. In addition, motor incoordination in the rota-rod was used to compare the development of so-called rapid tolerance to Δ^9 -THC and ethanol, as well as the development of rapid cross tolerance between both drugs in mice. The influence of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in the Δ^9 -THC-induced effects was also examined. Injection of Δ^9 -THC (8 mg/kg, i.p.) 30 min pre-test, significantly impaired spatial learning during acquisition in the water maze. Combined administration of THC and SR (1mg/kg, i.p.) significantly reversed the THC-induced deficit. Subsequent experiments showed that Δ^9 -THC (4, 6 or 8 mg/kg, i.p.) did not affect the retention of a previously learned spatial task. In the experiment aimed to evaluate working memory, THC (8 mg/kg, i.p.) 30 min prior to testing showed a tendency towards an impaired memory. Motor incoordination in the rota-rod was significantly reduced on day 2 in mice receiving THC (28 mg/kg, i.p.) on day 1, compared to the group pretreated with control solution. Mice injected with ethanol (2.25g/kg, i.p.) under identical experimental protocol confirmed the inducion of rapid tolerance to ethanol. A rapid cross tolerance was observed following ethanol and THC. These results suggest for the first time that systemic injection of Δ^9 -THC impairs spatial learning in a water maze and that this deficit may be mediated by central cannabinoid receptors. These findings also demonstrate that Δ^9 -THC can induce rapid tolerance in the two-day design and that this response may be useful to study tolerance in general for different drugs of abuse.

1-INTRODUÇÃO

1.1- MACONHA E RECEPTORES CANABINÓIDES

A maconha é a droga ilícita mais consumida no mundo. Está presente na sociedade há pelo menos 5000 anos. Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 1997, o número de usuários já ultrapassa os 140 milhões em todo o mundo, crescendo anualmente. No Brasil, a situação não é diferente. De acordo com o último levantamento, publicado no mesmo ano, pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), o consumo da droga entre os estudantes do 2º grau vem aumentando (GALDURÓZ et al., 1997).

Além do uso recreacional conhecido pelas pesquisas epidemiológicas, a maconha tem sido usada com finalidades medicinais há séculos, e seus produtos correlacionados foram amplamente prescritos até o início deste século. A principal razão para seu desuso médico foi, provavelmente, o não isolamento das substâncias ativas da maconha e o conseqüente uso das preparações brutas (extratos), cuja variabilidade química e deterioração com o tempo e luz faziam com que os efeitos clínicos fossem imprevisíveis. Além desta razão, existe outra de ordem legal e policial. Alguns países começam a relacionar o uso não médico (“abuso”) da maconha à degeneração psíquica, ao crime e a marginalização do indivíduo. Por conta destes, e outros motivos, em 1937 nos Estados Unidos foi baixado um decreto proibindo seu uso (BONNIE, 1974). No Brasil o uso e a venda foram proibidos pela Câmara de Comércio do Rio de Janeiro desde 1930.

Sendo a maconha, na época, uma droga proscrita, pouco se avançou na pesquisa. No final do século XIX, na tentativa de descobrir se um único ingrediente ativo era responsável pelos efeitos medicinais da maconha fumada ou ingerida, foram feitas cuidadosas análises químicas dos extratos da planta. O resultado da pesquisa culminou com o isolamento do chamado “óleo

vermelho tóxico”. Entretanto a estrutura química do delta 9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) não foi completamente estabelecida até o início dos anos sessenta. O constituinte ativo, tetrahydrocannabinol, foi isolado pela primeira vez na forma pura e sua estrutura elucidada em 1964 por GAONI e MECHOULAN. Além do Δ^9 -THC, inúmeros outros canabinóides foram identificados na planta, alguns como o canabidiol, dotado de propriedades terapêuticas, porém sem ação central (CARLINI, 1979).

Em 1967, Mechoulam e Gaoni definiram a classe dos canabinóides como a mais importante classe de compostos encontrados na planta *Cannabis sativa*. Estes compostos possuíam em comum uma estrutura com 21 carbonos típicos, incluindo neste grupo seus ácidos carboxílicos, análogos e produtos de transformação. Hoje, no entanto, estes compostos encontram-se dispostos em quatro classes: (1) canabinóides clássicos, tendo estrutura similar ao Δ^9 -THC; (2) canabinóides com estrutura bicíclica, como o CP 55,940; (3) aminoalquilindoles como WIN 55,212-2; e (4) metabólitos do ácido araquidônico, como a anandamida. A descoberta de compostos canabimiméticos adicionais, os quais diferiam suas estruturas dos canabinóides clássicos e não clássicos, tem justificado a rápida expansão na diversidade de compostos canabimiméticos. As propriedades farmacológicas de mais de 300 compostos canabinóides tem sido documentada (RAZDAN, 1986).

Devido a característica lipofílica e à ação perturbadora sobre a membrana celular, não se pensava que o Δ^9 -THC atuasse através de receptores específicos. Após muitos anos de estudos dos possíveis mecanismos envolvidos na ação da maconha e canabinóides. Devane e colaboradores (1988), evidenciaram a existência de receptores cannabinóides no cérebro. O descobrimento destes receptores foi alcançado com o uso da técnica de ensaio de união específica de receptor e o ligante de canabinóide sintético de alta afinidade, CP-55940. A

clonagem subsequente do receptor, designado receptor CB_1 , indicou que ele pertencia a família dos receptores ligados a proteína G (MATSUDA et al., 1990). Estudos similares de união específica com CP-55940 em tecido periférico, indicou que este tecido e algumas células do sangue (linfócitos) também possuem um receptor canabinoide. Entretanto, esses tecidos expressavam o receptor que diferia em seletividade dos receptores neurais (MUNRO et al., 1993). Esse receptor canabinoide periférico denominado CB_2 , foi clonado de células HL60 e seqüenciado, apresentando 44% de homologia com o CB_1 . Além destes receptores, a presença de uma isoforma truncada do receptor canabinoide central CB_1 tem sido relatada (SHIRE et al. 1995), e chamado CB_{1a} . A farmacologia deste receptor é quase idêntica àquela do CB_1 , exceto que a afinidade agonista específica para o CB_{1a} é ligeiramente reduzida quando comparada com CB_1 .

Os receptores CB_1 estão presentes em muitas regiões do cérebro, incluindo área olfatória, o córtex, o hipocampo, o cerebelo e o gânglio basal, enquanto o tálamo, hipotálamo e tronco cerebral possuem uma quantidade reduzida. Os receptores CB_2 têm sido detectados principalmente em tecidos periféricos, incluindo baço e macrófagos. Também há evidências que estes receptores são expressos em terminais nervosos periféricos. Receptores CB_2 foram também encontrados no vaso deferente e plexo mesentérico (PERTWEE, 1997).

A ativação de receptores canabinoídes leva à inibição da atividade da adenilato-ciclase (HOWLETT & FLEMING, 1984); à inibição de canais de Ca^{2+} (MACKIE & HILLE, 1992); à estimulação da liberação de ácido araquidônico; e à estimulação da cascata de MAPkinase que são independente de AMP cíclico. ?

Até no início dos anos noventa a farmacologia do receptor canabinoide era dificultada pela indisponibilidade de antagonistas específicos. Em 1994, Rinaldi-Carmona e colegas publicaram

resultados indicando que o SR141716A, um derivado pirazol, ligava com alta afinidade ao receptor CB₁ no cérebro de rato, e revertia completamente vários efeitos “in vitro” e “in vivo” do potente composto canabimimético WIN 55,212-2 (RINALDI-CARMONA et al., 1994). Foi observado que o SR 141716A não tinha nenhum efeito canabinóide quando administrado sozinho. A descoberta do SR141716A foi única porque o trabalho realizado por Rinaldi-Carmona e colegas demonstrou um antagonista canabinóide possuindo afinidade nanomolar.

Pouco antes da descoberta do composto SR 141716A, outro fato interessante foi relatado; compostos presentes no cérebro, derivados de ^{Lipídios → CB₁} ácidos graxos, se ligavam a receptores canabinóides (DEVANE et al., 1992). O primeiro a ser caracterizado foi o araquidoniletanolamida, que foi denominada de anandamida, baseado em sua natureza química (uma amida) e uma palavra oriunda do sanscrito ‘ananda’ que significa ‘alegria’, sendo proposto como canabinóide endógeno. Além deste, outros endocanabinóides estão sendo descobertos e a elucidação do papel destes compostos no organismo está sendo investigada (MECHOULAM et al., 1999).

1.2- CANABINÓIDES, POTENCIALIDADES E PROBLEMAS

Com toda a pesquisa neste campo, milhares de trabalhos científicos sobre a química e farmacologia dos canabinóides vêm se desenvolvendo. Até o início da década de 70, o problema com a variabilidade dos resultados poderia ser justificado, pela falta de controle e pureza na composição do hashishe, utilizado como fonte de Δ^9 -THC. Então, vários métodos de ensaio sensíveis para canabinóides foram desenvolvidos, sendo um dos procedimentos mais utilizados a cromatografia gasosa. Com o tempo, o Δ^9 -THC sintético tornou-se mais disponível possibilitando melhor controle das doses e por conseguinte maior confiabilidade nos

resultados. No entanto, mesmo próximos do fim deste século, com todas as descobertas a cerca dos canabinóides, o enquadramento da cannabis dentro do chamado Esquema I (USA) tem feito a moderna pesquisa clínica quase impossível. Isto, primariamente devido a dificuldades legais, éticas e burocráticas em conduzir experimentos com pacientes (DOBLIN e KLEIMAN, 1995).

Dificuldades a parte, muitos trabalhos descreveram as potencialidades terapêuticas do Δ^9 -THC e outros canabinóides como antiemético, antinociceptivo, antiglaucoma, estimulante do apetite, etc (HIRST, 1998). Embora os constituintes da planta apresentem todas estas potencialidades, há um grande número de estudos demonstrando um prejuízo funcional induzido pelo Δ^9 -THC numa variedade de testes de performance e cognitivos, incluindo prejuízo na memória, na discriminação de tempo e prejuízo em testes como tempo de reação, formação de conceito, aprendizado, percepção, coordenação motora, atenção e detecção de sinal. (MELGES et al., 1970; ABEL, 1971; FEHR et al., 1983; AIGNER, 1988; MOLINA-HOLGADO et al., 1993; HAMPSON, 1999).

A compreensão e abordagem de problemas relacionados ao uso de canabinóides possibilitou encontrar novos caminhos para desenvolvimento de canabinóides sintéticos, alguns desprovidos de ação central, além de ferramentas farmacológicas mais específicas para a compreensão do papel destes receptores no organismo humano.

1.3- Δ^9 -THC E MEMÓRIA

Dos efeitos do Δ^9 -THC, um dos mais discutidos é o prejuízo na memória. Relatos de usuários de maconha, descrevem que a memória é prejudicada, a concentração é dificultada e muitas vezes o indivíduo esquecia do que estava falando no início da conversa (TART, 1970).

Se estes relatos já são conhecidos há tempos, o substrato neural para ação do Δ^9 -THC em termos cognitivos é relativamente recente. A própria anatomia da memória só começou a ser melhor conhecida a partir da metade do nosso século com a análise de casos como de H.M. (SCOVILLE e MILNER, 1957), onde a importância de estruturas como o hipocampo, para a memória ficaram mais evidentes.

Experimentos eletrofisiológicos na década de setenta, utilizando neurônios do hipocampo, realizados por Bliss e Lomo (1973), mostraram que a estimulação elétrica em regiões do hipocampo produzia atividade neural nesta área que poderia ter uma amplitude maior do que quando foi estimulada e também era duradoura, assim caracterizou-se a potenciação de longo prazo (PLP), que com o tempo se estabeleceu como mecanismo neural para a memória. Com a crescente busca na compreensão deste fenômeno complexo, bem como de medidas psicológicas, como etapas (aquisição, consolidação e evocação) e a duração (curto e longo prazo) da memória ficaram mais claras.

Vários testes para avaliação de processos cognitivos foram utilizados para observar e compreender o mecanismo de ação do Δ^9 -THC. Conforme o tipo de teste era possível a avaliação dos tipos de memória, além da possibilidade de diferenciar em qual etapa do processo cognitivo a droga estaria atuando. Alguns experimentos ilustraram muito bem as visões correntes hoje, que reconhecem um número de diferentes formas ou aspectos de aprendizado e memória envolvendo diferentes sistemas neurais no cérebro (SQUIRE e KNOWLTON, 1994).

No início dos anos 70, Melges e colaboradores (1970) estudaram os efeitos de múltiplas doses de Δ^9 -THC administradas oralmente em humanos, sobre o funcionamento mental. Os testes foram efetuados para avaliar a memória recente e organização temporal. Quatro testes foram aplicados: *digit span* (DS) para frente e para trás, que consistia na medida de números de

dígitos que o indivíduo poderia reproduzir com acuracidade na mesma ordem, ou ordem inversa de apresentação, sendo um dos testes mais simples para estudar a memória de curto prazo; subtração serial de sete, um teste onde o sujeito tinha que iniciar uma operação de subtração a partir do número 100 (± 4) até passar de 0, este teste é menos dependente de memória recente e mais dependente de atenção e memória de longo prazo; e teste de alteração serial direcionada ao objetivo (ASDO), este era semelhante ao anterior só que além de subtrair o indivíduo tinha somar números de 1 a 3 até atingir determinado valor, o teste dependia da retenção do *input* recente relevante para o objetivo. Neste último teste, foi encontrado um prejuízo profundo na performance. Isso foi chamado de “desintegração temporal”, ou seja, o indivíduo tem dificuldade em reter, coordenar e listar serialmente aquelas memórias, percepções e expectativas que são relevantes a uma meta que ele se propõe. Prejuízo no *digit span* também foi demonstrado. Por outro lado, a subtração serial por 7 não foi significativamente afetada.

Casswell e Marks (1973), utilizando indivíduos usuários e não usuários, encontraram resultados semelhantes, porém não observaram prejuízos no teste DS. Os autores justificaram propondo que o Δ^9 -THC não prejudica significativamente testes mais simples de curta duração, como o DS, enquanto testes mais complexos envolvendo ambos memória de curto prazo e manipulação de informação serial são prejudicados, indicando um prejuízo de memória operacional.

À mesma época, Ernest Abel (1971), em experimentos para determinar os meios pelos quais a maconha afetava a memória em humanos, encontrou indicativos de que a maconha fumada após o teste não interferia com a lembrança de informações na memória, utilizando o teste de livre lembrança, mas afetava processos de reconhecimento. Este fato foi justificado

relacionando-o com problemas na atenção, ou seja, o indivíduo era incapaz de concentrar-se, e neste experimento, não conseguia ensaiar a palavra. O resultado era que a informação não podia ser transferida para a memória “permanente”.

Desde que se tem relatado que a maconha prejudica a lembrança, principalmente quando a informação é adquirida durante o estado da droga, mas não quando a informação tem sido codificada antes da intoxicação, tem sido sugerido que a droga influencia mais a consolidação que o processo de evocação (DARLEY & TINKLENBERG, 1974). Além disso, Miller e Brancomier (1983), após revisar a literatura sobre o efeito de canabinóides em humanos, concluíram que a perturbação mais frequentemente observada em usuários de maconha era o prejuízo na memória de curto prazo.

Experimentos realizados em macacos (AIGNER, 1988) utilizando um teste que requer memória de reconhecimento visual, a chamada amostra não complementar diferida (ANCD) e aprendizado de discriminação mostraram um efeito diferenciado da droga, ou seja, no reconhecimento visual a droga produz um prejuízo significativo, enquanto na discriminação não afeta a performance. Então, foi sugerido uma ação seletiva do Δ^9 -THC sobre o sistema límbico. O envolvimento do sistema límbico com o Δ^9 -THC ficou claro, mais tarde, com o mapeamento da distribuição dos receptores canabinóides no sistema nervoso central (SNC), e também com a revelação da alta densidade destes no hipocampo.

Experimentos também utilizando o ANCD em ratos, mostraram claramente a relação do Δ^9 -THC com o hipocampo (HEYSER et al., 1993). O prejuízo na memória era semelhante aos dos animais que sofriam danos no hipocampo, e que este efeito dependia do tempo de demora entre a apresentação da amostra e sua reapresentação. Além disso, dados eletrofisiológicos mostraram que a atividade das células hipocampais, durante as fases de apresentação da

amostra e demora foram alteradas drasticamente pelo Δ^9 -THC, além da própria característica dos disparos das células do hipocampo.

Um outro modelo utilizado para avaliação do efeito do Δ^9 -THC na memória é o labirinto radial de 8 braços, que mede a chamada memória de localização espacial. Desde o desenvolvimento do modelo (OLTON e SAMUELSEM, 1976), muitos experimentos foram realizados com o Δ^9 -THC (KALANT e STIGLICK 1982; NAKAMURA et al., 1991; LICHMAN et al., 1995). Os resultados claramente confirmam o prejuízo causado pelo Δ^9 -THC, assim como acontece em outros modelos onde o hipocampo está envolvido.

1.4-LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Um modelo mais interessante, constituindo um dos paradigmas mais utilizados para o estudo da memória é o Labirinto aquático de Morris (LAM). O LAM oferece várias vantagens sobre outros métodos de estudo das bases neuroquímicas do aprendizado e memória. Particularmente com respeito a sua capacidade em dissociar o déficit na formação da memória, do déficit em processos sensoriais, motores, motivacionais e de evocação (McNAMARA et al., 1993).

Neste modelo, o procedimento padrão consiste em colocar o animal em um tanque onde ele terá de encontrar uma plataforma escondida que permanece fixa em um dos quadrantes do tanque. A plataforma pode apresentar sua superfície acima do nível da água, sendo então visível para o animal, ou estar logo abaixo do nível da água, dessa forma escondida do animal. O LAM foi originalmente desenvolvido para testar a capacidade de ratos em aprender, lembrar e ir a um lugar no espaço definido somente por posição relativa a pistas distais extra labirinto.

Teóricos do estudo de memória em animais têm diferenciado a memória operacional de memória de referência (Olton et al., 1977). A memória de referência envolve registro de regras para uma resolução do labirinto, e é análoga à memória procedural, abstrativa, ou memória de hábito (SQUIRE e BUTTERS, 1984). Por outro lado, a memória operacional envolve o registro da informação que poderia ser usada no mapa espacial cognitivo, e é análoga a memória declarativa, experiencial. Memória operacional é a capacidade de manter um item de informação transitório na mente no serviço de compreensão, pensamento e planejamento (BADDLEY, A. 1986). A memória operacional abrange ambos, armazenamento e processamento das funções, ou seja, a utilização dos registros, lembranças para solucionar uma nova tarefa.

É importante observar a distinção entre o LAM como um aparelho e o LAM como um conjunto de distintos procedimentos e protocolos (STEWART e MORRIS, 1993). No procedimento padrão o animal precisa localizar uma plataforma submersa, utilizando predominantemente a memória de referência espacial. Este tipo de memória é dita ensaio independente, isto é, não importa o número de ensaios, sempre a plataforma se encontrará na mesma posição, e o animal manterá a lembrança da localização da plataforma ao longo dos ensaios (MCNAMARA e SKELTON, 1993).

Uma variação no protocolo do LAM permite investigar a memória operacional. Neste caso a plataforma submersa é colocada a cada dia em posição diferente no tanque, o escopo da medida é comparar a performance do animal entre o primeiro e os ensaios subseqüentes. Desta forma, esta memória é dita ensaio dependente, ou seja, o animal necessita lembrar a localização da plataforma a partir do primeiro ensaio dentro da sessão do dia (STEWART e MORRIS, 1993; BARNES, 1988).

Na situação onde a plataforma está submersa, o animal pode somente aprender a encontrá-la usando estratégia espacial, nadando para uma mesma localização no tanque onde está a plataforma. Para o animal, o lugar onde está a plataforma é definido pela posição desta em relação às pistas perceptíveis não locais, ou seja, objetos externos ao labirinto.

Quando a plataforma é visível, o animal pode aprender a encontrá-la usando estratégia não espacial, ou espacial. A primeira inclui a chamada estratégia por pista, na qual o animal guia seus movimentos relativos a uma única pista no ambiente (neste caso a plataforma) ou ainda estratégia de resposta (praxes) no qual o animal se move de acordo com uma seqüência específica de movimentos. Essas estratégias são menos eficientes no LAM.

A maioria dos estudos de lesão tem fundamentado que os mapas cognitivos são implementados pelo hipocampo. A completa retirada do hipocampo, destruição ou inativação do hipocampo dorsal, transecção da fimbria fórnix, ou lesão no septo medial, causa severo prejuízo na navegação de lugar no LAM (BURES et al. 1997). Sendo assim, a utilização do LAM como modelo para a avaliação de drogas que têm ação sobre o hipocampo se torna interessante.

1.5- Δ^9 -THC, TOLERÂNCIA E TOLERÂNCIA RÁPIDA

Outra questão que é observada em testes quando se administra Δ^9 -THC repetidamente é a resistência a alguns efeitos da droga, isto é, o aparecimento do fenômeno tolerância. Curiosamente, ocorrem situações onde indivíduos chegam até mesmo a demonstrarem aumento da performance em alguns testes. No caso de humanos, frequentemente isto é verificado em usuários experientes, e a possibilidade de que a tolerância tenha se desenvolvido, ou que

alguma outra compensação tenha ocorrido, não pode ser desconsiderada (ABOOD e MARTIN, 1992).

Até o início dos anos setenta havia muitas dúvidas sobre a ocorrência do desenvolvimento de tolerância à maconha e seus constituintes (CARLINI, 1968; DENEU e KAYMAKCALAN, 1971). Um dos primeiros estudos definitivos foi conduzido por McMillan et al. (1971), o qual mostrou que administração de doses elevadas de Δ^9 -THC para cachorros e pombos sobre uma base contínua resultava em uma profunda tolerância, ainda que a síndrome de abstinência não ocorresse, quando a droga era removida. Por outro lado, Ferraro e Grilly (1972), medindo a performance de chimpanzés no teste de ACD, mostraram que o desempenho dos animais era significativamente afetado pelo Δ^9 -THC, porém, mesmo com administração repetida na dose de 4 mg/kg durante 42 dias não encontraram tolerância. Outro estudo sugeria ainda que o ser humano poderia tornar-se mais sensível a alguns dos efeitos da maconha sobre administração repetida mais que tolerante (WEIL et al., 1968). Também se justificava a falha da tolerância relacionando-a com a via de administração, pureza da droga, ou espécie animal.

Com a evolução das investigações o desenvolvimento de tolerância para os efeitos farmacológicos de canabinóides foi estabelecido, sendo então descritos em várias espécies, incluindo pombos, roedores, cachorros, macacos e coelhos. Por exemplo, tem sido demonstrado tolerância para antinocicepção (MARTIN, 1985), catalepsia (PERTWEE, 1974), depressão de atividade locomotora (KARLER, et al. 1984), hipotermia (THOMPSON et al. 1974) e ataxia em cães (MARTIN, et al 1976).

Uma questão importante no estudo da tolerância é que ela não se manifesta globalmente, como acontece com muitas drogas psicotrópicas. Com opióides, por exemplo, a tolerância pode ocorrer mais rapidamente para alguns efeitos do que outros. Outro aspecto é o tempo, a

tolerância aos efeitos da maconha pode desenvolver-se rapidamente após umas poucas doses, porém também desaparece rapidamente. Já com relação as doses maiores, a tolerância encontrada em animais experimentais pode persistir por longos períodos após a cessação do uso da droga (O'BRIEN, 1996).

Basicamente, a tolerância à drogas pode ocorrer por dois mecanismos: mudanças farmacocinéticas (disposicionais ou metabólicas) ou farmacodinâmicas. Tolerância farmacocinética se refere a mudanças na distribuição ou metabolismo da droga após repetidas administrações. Assim, a concentração da droga é reduzida na circulação e subseqüentemente também no seu sítio de ação. Já na tolerância farmacodinâmica ocorre uma mudança adaptativa que toma lugar no sistema afetado pela droga. Deste modo, aquela resposta a uma dada concentração da droga é reduzida (GOODMAN e GILMAN, 1996). Várias linhas de evidências indicam que fatores farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) provavelmente tenham um papel menor na produção de tolerância (DEWEY et al., 1976; SIEMENS e KALANT, 1974; MARTIN et al., 1976). Assim, eventos farmacodinâmicos como *down-regulation* do receptor, mudança conformacional do receptor e internalização do receptor são possíveis candidatos a elucidação do fenômeno.

Alguns grupos (OVIEDO et al., 1993; RODRIGUEZ de FONSECA et al., 1994) têm demonstrado *down-regulation* em receptor canabinóide em animais tolerante a canabinóides. *Down-regulation* do receptor ocorre quando o número de receptores presentes na célula é reduzido. Oviedo e colaboradores (1993) sugerem que a tolerância a canabinóides era devido em parte a *down-regulation* do receptor induzida pelo agonista. Em animais tratados agudamente com Δ^9 -THC ou CP 55,940 a união específica alterada resultou na mudança da afinidade. No tratamento crônico, as mudanças na união específica foram atribuídas a uma

diminuída capacidade de união específica. Rodriguez de Fonseca e colaboradores (1994) encontraram tolerância comportamental em ratos tratados cronicamente com Δ^9 -THC. Esta tolerância foi acompanhada com diminuição da união específica no estriado e prosencéfalo límbico.

Em experimentos onde o fenômeno de tolerância é avaliado, é importante a consideração do fator aprendido que, neste caso, se refere à tolerância aprendida, isto é, redução do efeito da droga devido a mecanismos compensatórios que são aprendidos. Dentro desta classificação existe um caso especial de tolerância comportamental, chamada tolerância condicionada, e que envolve um mecanismo de aprendizado desenvolvido quando pistas ambientais como visão, cheiro ou situações são consistentemente pareadas com a administração da droga. Quando a droga afeta o balanço homeostático pela produção de sedação, mudanças na pressão sanguínea, razão de pulsação, atividade intestinal etc., há freqüentemente uma neutralização reflexa ou adaptação na tentativa de restaurar o *status quo*. Se o animal sempre recebe droga na presença de pistas ambientais específicas (cheiro da droga, visão do procedimento de injeção, etc.) , estas pistas acabam predizendo o aparecimento da droga para o animal. Então, mecanismos de adaptação são ativados mesmo antes da droga atingir seu sítio de ação. Quando a droga é recebida em circunstância nova e não esperada, a tolerância é reduzida e o efeito da droga acentuado (WIKLER, 1973; SIEGEL, 1976).

A tolerância baseada no aprendizado tem sido considerada como diferente do tipo clássico de tolerância celular/metabólica, levando a um aumento da tolerância celular pela prática droga-intoxicação. Este tipo de tolerância praticamente está presente em todos os tipos de tolerância por déficit comportamental induzido pela droga. Apesar disto, tolerância celular e comportamental podem ser separadas, o tipo celular segue o fator temporal de exposição a

droga e o tipo comportamental requer experiência com o comportamento alterado e oportunidade para desenvolver resposta aprendida adaptativa.

Com relação ao tempo em que se desenvolve, a tolerância pode ser classificada em : tolerância aguda, crônica ou rápida. A primeira é evidenciada dentro do intervalo de tempo em que uma única dose é apresentada ao sujeito. Na Segunda, o desenvolvimento ocorre após a administração repetida da droga (TABAKOFF, B. et al. 1986). Por último, a tolerância rápida que é observada em resposta a uma segunda dose da droga dada 8-24 h após uma única prévia exposição a droga (CRABBE et al., 1979; KHANNA et al., 1996).

Para a maioria das drogas, como benzodiazepínicos, barbitúricos, álcool, opióides, canabinóides e outras, o fenômeno mais evidenciado é a tolerância crônica. A tolerância aguda é um pouco menos evidenciada tendo como conhecidos exemplos, a ação do álcool e da cocaína. Já a tolerância rápida, foi inicialmente descrita por Crabbe e colaboradores (1979) e é bem estabelecida para drogas depressoras como barbitúricos e álcoois . Para cannabinóides, apenas um trabalho demonstrou tal fenômeno em ratos, utilizando o modelo de hipotermia (PERTWEE et al. 1993).

Embora a tolerância à droga em muitas situações seja mais facilmente demonstrada e medida, há um aumento da consciência do fato que o desenvolvimento dessa resposta seja resultante de uma complexa resposta multifatorial, isto é, influenciada por fatores comportamentais e ambientais (KARCZ-KUBICHA e LILJEQUIST, 1995).

1.6- TOLERÂNCIA CRUZADA Δ^9 -THC E ETANOL

Entre os usuários de droga não é comum a utilização de um único tipo de droga. Assim, com os usuários de maconha tal fato não é diferente e ela é freqüentemente utilizada em

combinação com o álcool (NORTON e COLLIVER, 1988). Na utilização de várias drogas, um fato que muitas vezes é evidenciado é a diminuição do efeito de uma droga em decorrência do uso anterior de outra droga. Quando isto ocorre, tem-se caracterizado o fenômeno de tolerância cruzada.

Por exemplo, uma observação antiga, de que os efeitos comportamentais do etanol eram atenuados em usuários crônicos de maconha sugeriu a possibilidade de haver tolerância cruzada entre as duas drogas. Newman e colaboradores(1972) mostraram que em teste de esquiiva, os ratos machos tornavam-se tolerantes ao etanol e Δ^9 -THC e que a administração de uma das drogas afetava o efeito da outra, independentemente da ordem de administração da droga, ou seja, simetricamente. Um outro estudo (SPRAGUE e CRAIGMILL, 1976), utilizando a medida da performance motora em camundongos no aparelho de rota-rod, demonstrou também tolerância cruzada entre as duas drogas e também de maneira simétrica. Entretanto, outros investigadores (KALANT e LE BLANC, 1974) não evidenciaram tolerância ao etanol em ratos que haviam se tornado tolerantes ao Δ^9 -THC, utilizando o modelo da esteira rolante.

Além disso, outros estudos mostraram que a tolerância cruzada entre etanol e Δ^9 -THC em roedores não era resultante de mudanças disposicionais geradas por cada droga (SPRAGUE e CRAIGMILL, 1976; SIEMENS e DOYLE, 1979). Estudo recente (BASAVARAJAPPA e HUNGUND, 1999) demonstrou “down-regulation” do receptor canabinoide CB1 em membrana plasmática de camundongos tratados cronicamente com etanol. Outros trabalhos também demonstraram que o sistema do receptor CB1 pode ter um papel na produção das ações farmacológicas do etanol.

1.7- Δ^9 -THC, LABIRINTO AQUÁTICO E TOLERÂNCIA

Poucos experimentos foram realizados com canabinóides utilizando labirinto aquático. Semjonow e Binder (1985), utilizando um labirinto aquático em forma de “T”, mostraram que o Δ^9 -THC possui propriedade discriminativa, apresentando uma DE_{50} de 1,8 mg/kg. Outro estudo, utilizando uma amida análoga ao Δ^9 -THC descreveu a distribuição deste composto entre triglicerídios e fosfolipídios no cérebro comparando com o THC (FRANQUE et al. 1985). Ainda, o canabinóide sintético HU211, foi testado em ratos para verificar sua propriedade cérebro protetora (SHOHAMI et al., 1995).

Um dos poucos trabalhos onde se investigou o efeito do Δ^9 -THC sobre o aprendizado, com um modelo de labirinto aquático, foi realizado por Pasquale e colaboradores (1978), onde o tratamento com resina de cannabis, em baixas doses, equivalente a 0,5mg/kg de Δ^9 -THC, demonstrou melhorar o aprendizado, enquanto com doses altas, 5 mg/kg, o aprendizado foi prejudicado. Mais recentemente utilizando o LAM, foi demonstrado que o agonista canabinóide HU-210 prejudicava o aprendizado espacial, mas não o aprendizado por pistas, ou seja, com a plataforma visível (FERRARI et al., 1999).

Avaliando estes experimentos nota-se que nenhum abordou a aprendizagem/memória de maneira a determinar em qual etapa desde processo cognitivo a droga estaria interferindo. Além disso, no LAM, não ficou definido como o animal se comportaria sob ação da droga onde o procedimento experimental envolve memória de referência espacial, e em outra situação, memória operacional.

Apesar do efeito prejudicial do Δ^9 -THC sobre a memória espacial já ter sido demonstrado em ratos no modelo do labirinto radial, as diferentes condições e vantagens do LAM devem ser consideradas. Entre as vantagens estão: (1) O aprendizado do animal é relativamente rápido;

(2) A motivação do animal pode ser observada facilmente, por exemplo alterando a temperatura da água; (3) o prejuízo motor também é fácil de ser verificado; (4) pistas dentro do labirinto, como odor, são atenuadas. Sendo assim, o presente trabalho foi delineado para verificar a interferência do Δ^9 -THC em diferentes etapas da memória neste modelo e o envolvimento dos receptores canabinóides CB1 nas possíveis ações da droga em camundongos, uma espécie que sob efeito deste canabinóide ainda não foi avaliada no LAM.

Para a maioria das drogas a tolerância é resultado da repetida exposição as mesmas por período prolongado. Contudo, conforme discutido anteriormente existe uma situação, já bem caracterizada para o etanol (KHANNA et al., 1996), onde é possível observar tolerância a droga, após uma segunda exposição. Esta é a chamada tolerância rápida. Um modelo bastante explorado para o estudo da tolerância é o do rota-rod, que mede o desempenho motor dos animais, porém para o Δ^9 -THC a tolerância rápida no rota-rod ainda não foi abordada.

Sabendo da capacidade da droga de induzir o fenômeno de tolerância e o possível envolvimento deste com aprendizado e memória. Então, o presente trabalho, também procurou avaliar o fenômeno de tolerância rápida para o Δ^9 -THC, pois poderia revelar mecanismos de tolerância semelhantes, por exemplo, com a determinação da tolerância rápida cruzada, e isto de maneira mais rápida e econômica.

2-OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do Δ^9 -THC sobre diferentes etapas do processo de memória de referência espacial, aquisição, consolidação e evocação no labirinto aquático de Morris, em camundongos.
- Verificar se a ação do Δ^9 -THC é via receptores CB1, utilizando para isto, o antagonista canabinoide SR 141716A.
- Avaliar o efeito do Δ^9 -THC sobre a memória operacional no labirinto aquático de Morris.
- Investigar o fenômeno de tolerância rápida para o Δ^9 -THC de maneira comparativa ao etanol no aparelho de rota-rod.
- Verificar a capacidade do antagonista SR 141716A em bloquear o desenvolvimento de tolerância para o Δ^9 -THC e etanol.
- Avaliar o desenvolvimento de tolerância cruzada rápida para o Δ^9 -THC e etanol.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos suíços machos, pesando entre 25 e 35 g, com idades entre 2,5 e 3 meses, oriundos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em temperatura constante ($23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em ciclo de claro escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida. Antes do início de cada sessão experimental, realizada entre 8:00 e 13:00, os camundongos foram ambientados no laboratório, pelo período de pelo menos 1 hora.

3.2 Drogas

Δ^9 -THC obtido do National Institute of Drug Abuse (Bethesda, USA) em ampola de 200 mg/ml em álcool, foi gentilmente cedido pelo Departamento de Psicobiologia, UNIFESP. A concentração apropriada de Δ^9 -THC era preparada imediatamente antes do uso evaporando o álcool e emulsificando o resíduo com tween-80 (TAKAHASHI e SINGER, 1979) e diluída com solução salina. O antagonista canabinóide SR141716A (SANOFI Recherche, França), foi homogeneizado com uma gota de Tween 80 e, em seguida, dissolvido em salina (0,9 %) até completar o volume desejado. O etanol (Merck, RJ) foi diluído a 14% v/v em salina. A solução controle consistiu de salina mais uma gota de Tween 80. Todos os animais foram injetados com as drogas ou controle via i.p. num volume de 10 ml/kg.

3.3 Aparelhos e procedimentos

3.3.1 Teste no Labirinto Aquático de Morris - LAM

O labirinto aquático de Morris (figura 1) consistiu de um tanque circular (70 cm de diâmetro e 60 de altura), confeccionado em fibra de vidro e de cor branca. O nível d'água ficou em torno de 45 cm e a plataforma (7X7 cm) estava submersa 1 cm abaixo da superfície. O camundongo era colocado no tanque com o focinho voltado para a parede e tinha 120 s para encontrar a plataforma, caso não conseguisse era guiado até ela. Após encontra-la permanecia 20 s nesta para reconhecimento espacial. Para a retirada do animal da plataforma era apresentado ao animal uma tábua na qual o animal subia, este artifício evitava que o animal saltasse da plataforma, evitando situação de estresse.

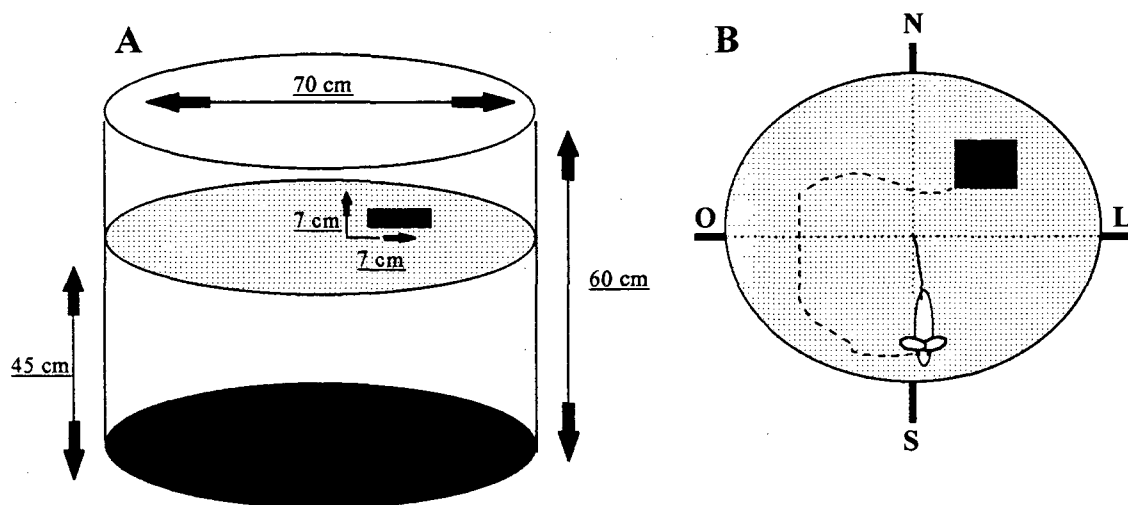


Fig 1. Desenho esquemático do labirinto aquático de Morris (A) dimensões do tanque; (B) esquema de procedimento padrão.

Basicamente o procedimento padrão (McNAMARA E SKELTON, 1993) foi utilizado, o tanque foi dividido em quatro quadrantes noroeste, nordeste, sudoeste e sudeste. A plataforma foi colocada no centro do quadrante nordeste e permaneceu nesta posição até o final do experimento. Cada camundongo foi testado em sessões diárias. A sessão consistia de quatro ensaios (intervalo de 20 s), no qual o animal era colocado cada vez em uma das quatro posições, norte, sul, leste, oeste, em ordem aleatória.

Além da medida de latência para encontrar a plataforma, foi registrado o número de vezes que o animal cruzava cada linha imaginária que dividia os quadrantes, servindo este parâmetro como medida de capacidade de movimentação do animal.

TABELA I. Esquema de procedimento experimental no LAM.

<i>Tipo de Experimento</i>	<i>Esquema de injeção</i>	<i>de</i>	<i>Drogas</i>	<i>Núm. de sessões</i>	<i>Plataforma</i>
Efeito do THC sobre a aquisição	30 min antes da sessão	da	THC 4,6 e 8 mg/kg SR 1 mg/kg * e controle	7	Fixa
Efeito do THC sobre a consolidação	Imediatamente após a sessão	após	THC 8 mg/kg e controle	10	Fixa
Efeito do THC sobre a evocação	30 min antes da sessão sete	da	THC 4,6 e 8 mg/kg e controle	7	Fixa
Efeito do THC sobre a memória operacional	30 min antes do teste **	do teste	THC 8 mg/kg e controle	8-12	Móvel

* O SR quando adm. com o THC era aplicado 10 min antes deste, e isoladamente 40 min antes da sessão.

**A droga neste experimento era adm. somente depois do animal atingir um critério, ver texto.

Um protocolo diferenciado do procedimento anterior foi utilizado para verificar o efeito da droga sobre a memória operacional. A plataforma foi posicionada em uma das quatro posições norte, sul, leste ou oeste. O animal era colocado no tanque em sessões com quatro tomadas

cada, numa seqüência aleatória nos três quadrantes restantes, sendo que em um deles duas vezes. Cada dia existia uma nova posição para a plataforma e os animais também eram colocados em posições diferentes. A droga só foi administrada quando o animal atingisse uma linha estável mínima de tempo que era calculada da seguinte maneira: média das tomadas do dia D mais média do dia seguinte dividido por dois o resultado não podia ultrapassar 14, ou seja o animal só era injetado com a droga quando a latência para encontrar a plataforma se estabilizasse. Esse valor proposto era adequado as condições do tanque. Com a administração da droga se verificava o efeito sobre a memória operacional do animal, comparando a média obtida com o valor resultante da aplicação da droga.

3.3.2 Teste do rotarod

O aparelho Rotarod (figura 2), Rotamex-V-EE/85 (Columbus Instruments, USA) consistiu de uma caixa acrílica dividida em quatro compartimentos com um eixo giratório entre eles. Este eixo podia girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1rpm/s. Abaixo do eixo, localizava-se um sistema fotoelétrico, que permitia o registro de queda do animal e a aplicação de um choque de 0 a 1 mA. O equipamento estava acoplado a um computador PC-XT, tornando possível a programação dos experimentos e o registro dos dados.

Os camundongos foram submetidos a 3 sessões de treino diárias no aparelho do rota-rod, sob aceleração contínua (1rpm/s) durante 5 dias, visando a seleção para os experimentos. Ao cair recebiam um choque de 0,3 mA. Após o período de testes, foram selecionados aqueles que

se mantinham em uma linha de base entre 20 e 40 rpm. Aproximadamente 80 % dos animais foram aproveitados.

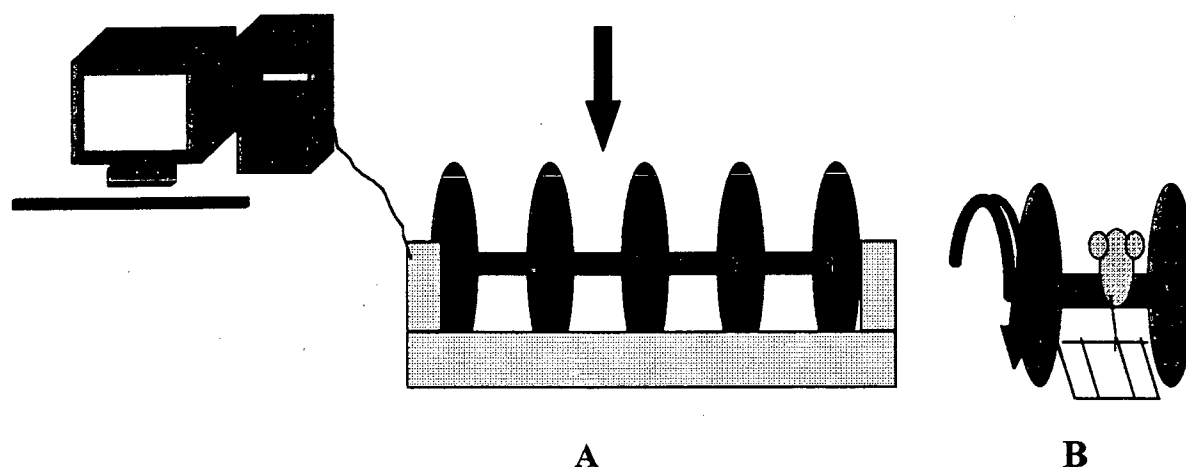


Fig 2. Desenho esquemático do aparelho de rota-rod acoplado a um computador (A) e procedimento experimental onde o camundongo é colocado em um dos compartimentos (B).

Antes da realização das investigações principais foi determinado a dose-resposta para o Δ^9 -THC para o prejuízo motor no aparelho, testando doses de 8, 15, 20 e 28 mg/kg. Também foi determinado a dose do antagonista canabinóide SR 141716A capaz de reverter este prejuízo, as doses testadas foram 1, 2 e 4 mg/kg.

Basicamente duas investigações foram feitas. Na primeira (tabela 2), onde foi avaliado a tolerância rápida ao etanol e Δ^9 -THC e tolerância cruzada entre essas drogas, os animais após terem sido treinados receberam no primeiro dia solução controle, etanol (2,25 mg/kg) ou Δ^9 -THC (28 mg/kg). Trinta, 60 e 90 min mais tarde foram testados no rota-rod. Depois então retornaram para as suas caixas. No dia 2, os grupos tratados com solução controle receberam

etanol ou Δ^9 -THC, enquanto os outros dois grupos receberam o mesmo tratamento do dia anterior. Trinta min mais tarde eles foram testados para avaliação da tolerância.

TABELA II. Esquema do procedimento no aparelho de rota-rod para verificar a tolerância rápida e cruzada.

GRUPOS	DIA 1			DIA 2		
	MEDIDA	SUB-GRUPOS	TESTE	MEDIDA	SUB-GRUPOS	TESTE
E ETANOL	B A S A L	E1 Etanol E2 Etanol E3 Etanol	30,60,90min	B A S A L	E1 Etanol E2 THC E3 Controle	30,60,90min
T THC	B A S A L	T1 THC T2 THC T3 THC	30,60,90min	B A S A L	T1 Etanol T2 THC T3 Controle	30,60,90min
C CONTRO LE	B A S A L	C1 Controle C2 Controle C3 Controle	30,60,90min	B A S A L	C1 Etanol C2 THC C3 Controle	30,60,90min

Na segunda investigação (tabela 3), proposta para avaliar a influência do antagonista SR 141716A sobre o desenvolvimento de tolerância rápida para o etanol e Δ^9 -THC o procedimento foi o seguinte: No dia 1, camundongos treinados foram divididos em dois grandes grupos os que receberiam como pré-tratamento solução controle e aquele que receberiam SR 141716A. Dez min depois, metade dos animais de cada grupo receberam etanol (2,25 g/kg) ou Δ^9 -THC (28 mg/kg). Trinta, 60 e 90 min mais tarde eles foram colocados no

rota-rod. No dia 2, etanol ou Δ^9 -THC foi administrado nos mesmos grupos de animais do dia anterior e a rápida tolerância foi acessada no rota-rod.

TABELA III. Esquema do procedimento para verificar a influência do antagonista SR na tolerância.

GRUPOS	DIA 1			TESTE	DIA2		
	MEDIDA	PRÉ-TRAT.	TRAT.		MEDIDA	TRAT.	TESTE
CONTRO LE	B A S A L	CONTRO LE	Etanol THC Controle	30,60,90min	B A S A L	Etanol THC Controle	30,60,90min
SR	B A S A L	SR	Etanol THC Controle	30,60,90min	B A S A L	Etanol THC Controle	30,60,90min

4-ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas entre as médias dos grupos foram inicialmente realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma, ou duas vias com medidas repetidas, conforme o protocolo experimental. Posteriormente os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste LSD de Tukey . Também foi utilizado o teste t de Student. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.). a probabilidade aceita como indicativo da existência de diferenças estatisticamente significantes foi $p \leq 0,05$. Tendências foram consideradas valores de F com probabilidade entre 0,05 e 0,1.

5 - RESULTADOS

5.1 Efeito do Δ^9 -THC sobre a aquisição da memória de referência espacial

Os resultados deste experimento são mostrados na figura 3. Todos os animais foram capazes de nadar em torno da plataforma e localiza-la subindo nela. Não havia nenhum sinal visível de qualquer prejuízo motor durante o nado ou tentativa de subir na plataforma. Observou-se um progressivo declínio na latência de fuga com o treino. Uma ANOVA da latência de fuga para os sete dias de sessões revelou um significativo efeito do tratamento [$F_{3,40} = 3,985$ $p < 0,0142$] e do dia [$F_{6,240} = 38,053$ $p < 0,00001$]. A interação entre os dois fatores não foi significativa [$F_{18,240} = 1,443$ $p < 0,1124$].

Uma análise posterior entre os tratamentos, usando o teste LSD, mostrou que somente o tratamento com 8 mg/kg de Δ^9 -THC levou a um aumento significativo na latência em relação ao grupo controle. A dose 4 mg/kg praticamente não interferiu na performance e 6 mg/kg mostrou apenas uma tendência. Este déficit foi mais pronunciado nos primeiros dias, nas últimas sessões os camundongos tratados com 8 mg/kg de Δ^9 -THC estavam encontrando a plataforma tão bem quanto os outros.

Na medida de linhas cruzadas, apresentada na figura 4, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito do tratamento [$F_{3,40} = 1,016$ $p < 0,3959$]; Com relação ao fator dia houve diferença significativa [$F_{6,240} = 31,787$ $p < 0,00001$]; A interação dos dois fatores não mostrou diferença [$F_{18,240} = 0,977$ $p < 0,4867$]. Contudo, comparação posterior utilizando o teste LSD encontrou diferença no primeiro e segundo dia no grupo tratado com 8 mg/kg e no quarto e sexto dia para o grupo de 6 mg/kg, estas duas doses nestes dias levaram a um aumento no número de linhas cruzadas, em relação ao grupo controle.

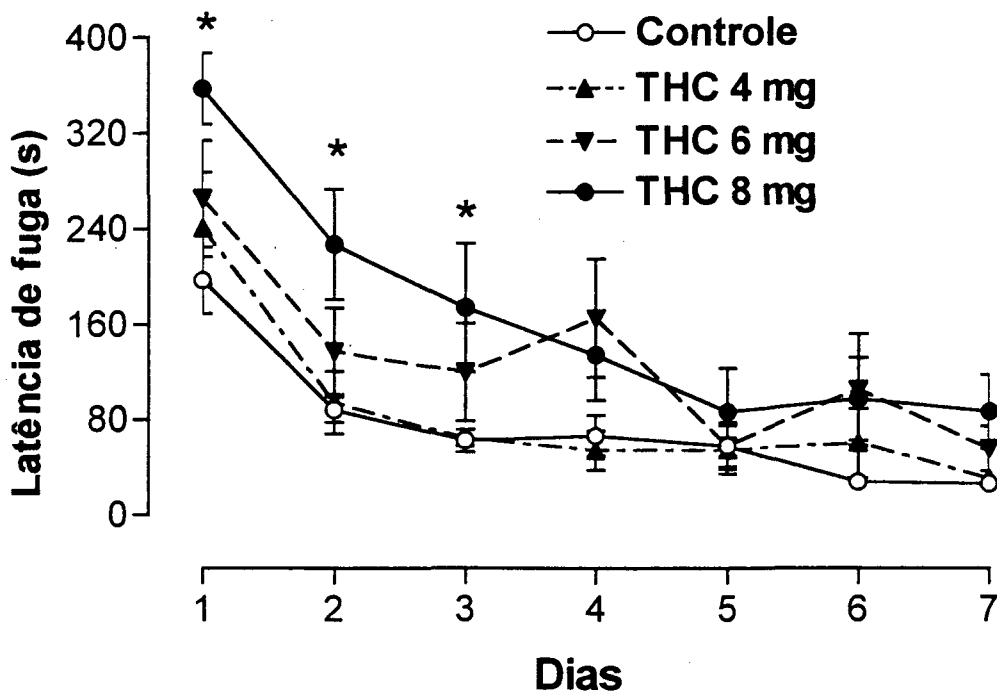


Fig 3. Efeitos de diferentes doses de Δ^9 -THC sobre a latência para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático. Δ^9 -THC ou veículo foram aplicados 30 min antes de cada sessão todos os dias. Cada ponto representa a média \pm EPM de 8-15 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste LSD comparando com o grupo controle.

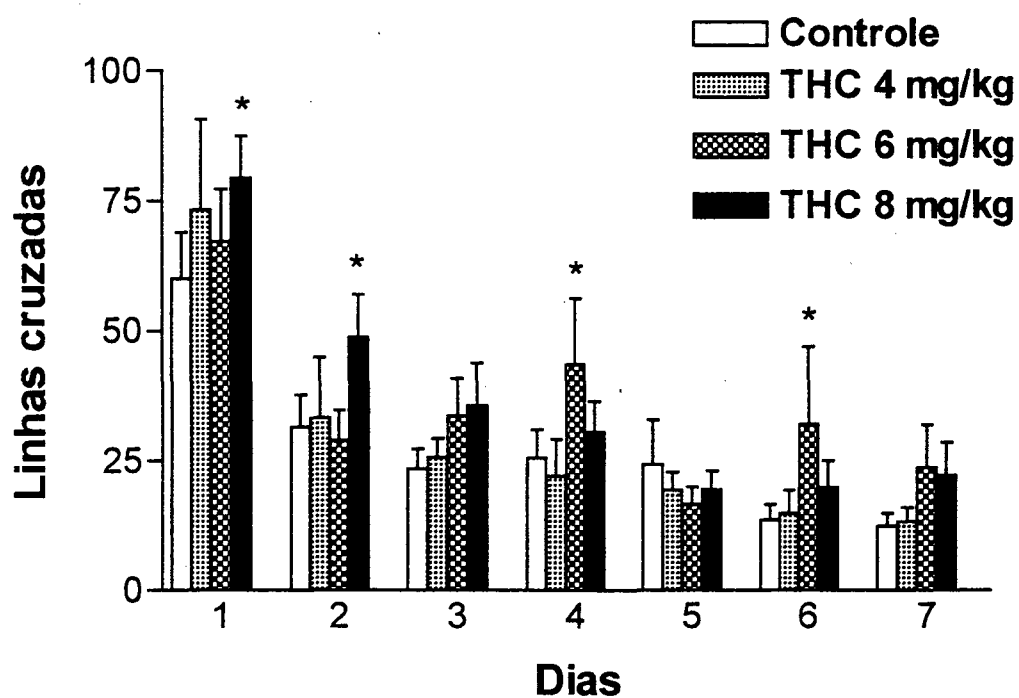


Fig 4. Influência de diferentes doses de Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado dos animais. As drogas ou solução controle foram injetadas diariamente 30 min antes de cada sessão. As barras representam a média \pm EPM de 8-15 animais por grupo. * $p < 0,05$; teste LSD comparando com o grupo controle.

5.2 Efeito do antagonista SR 141716A sobre a aquisição da memória de referência espacial.

A influência do antagonista canabinoide SR 141716A (1 mg/kg) em antagonizar o prejuízo sobre a aquisição da tarefa, resultante da administração de 8 mg/kg de Δ^9 -THC é mostrado na figura 5. Uma ANOVA de duas vias revelou um significativo efeito do tratamento [$F_{3,39} = 5,329$ $p < 0,0036$]; do dia [$F_{6,234} = 36,329$ $p < 0,00001$]; e interação entre os dois fatores dia e tratamento [$F_{18,234} = 2,007$ $p < 0,0102$]. Indicando assim o prejuízo do Δ^9 -THC 8 mg/kg sobre o aprendizado. SR 141716A 1 mg/kg reverteu completamente o prejuízo causado pela dose de 8 mg/kg. A administração isolada do antagonista, não demonstrou qualquer efeito, comparado ao grupo controle.

Na avaliação da capacidade de nado dos animais, mostrado na figura 6, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito do tratamento [$F_{3,39} = 0,810$ $p < 0,4961$]; Para o fator dia o efeito foi significativo [$F_{6,234} = 33,745$ $p < 0,00001$], a interação dos dois fatores não mostrou diferença [$F_{18,234} = 0,946$ $p < 0,5235$]. Apenas o grupo que recebeu 8 mg/kg de Δ^9 -THC, demonstrou um aumento significativo no número de linhas cruzadas, no primeiro e segundo dia, em relação ao grupo controle teste LSD, $p < 0,01$.

5.3 Efeito do Δ^9 -THC sobre a consolidação da memória

Os resultados deste experimento se encontram na figura 7. A administração da droga, foi feita logo após cada sessão, todos os dias. No dia seguinte o animal era então testado sem a droga. Neste experimento não foi observado prejuízo na performance do animal. ANOVA para o tratamento não mostrou efeito significativo [$F_{1,20} = 1,336$ $p < 0,2614$]; No entanto, uma diferença significativa foi observada ao longo dos dias [$F_{9,180} = 17,588$ $p < 0,00001$]. A intera-

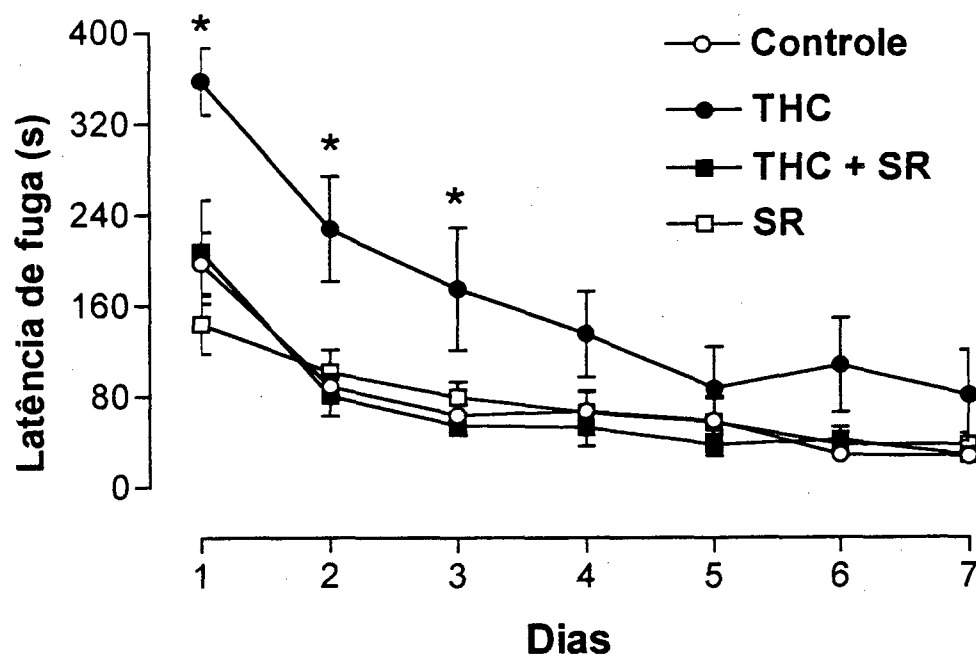


Fig 5. Efeito do Δ^9 -THC (8mg/kg), SR 141716A (1mg/kg) e combinação THC + SR sobre a latência para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático. Δ^9 -THC ou veículo foram aplicados 30 min antes de cada sessão todos os dias. Cada ponto representa a média \pm EPM de 8-15 animais por grupo.

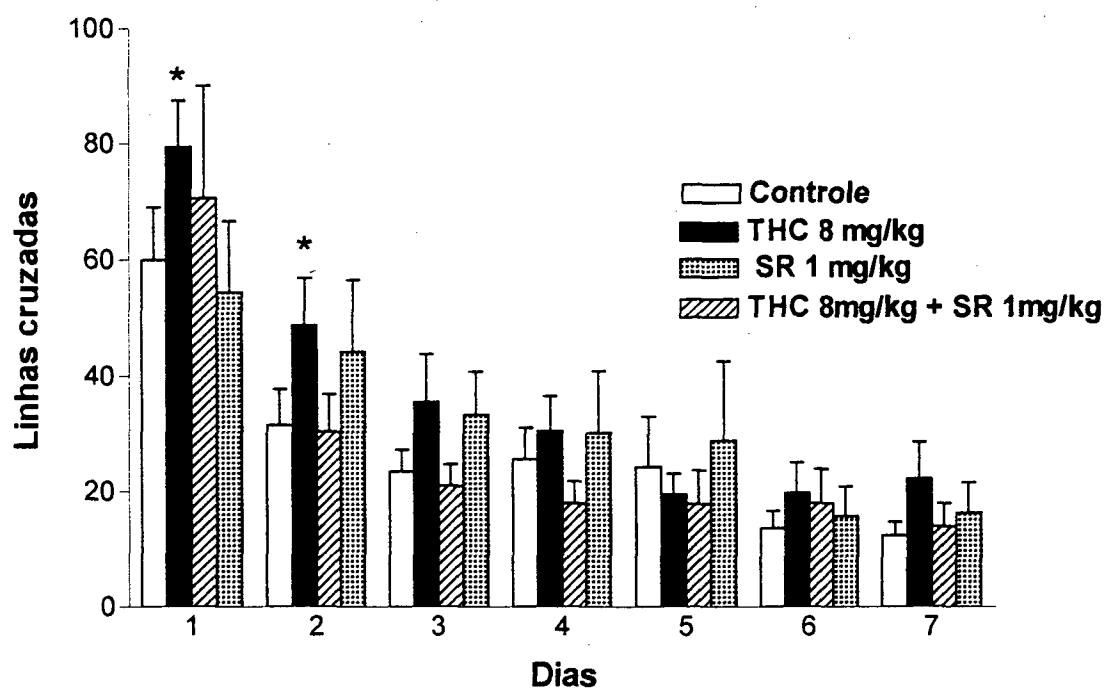


Fig 6. Influência do Δ^9 -THC, SR 141716A e combinação THC + SR sobre a capacidade de nado dos animais. As drogas ou solução controle foram injetadas diariamente 30 min antes de cada sessão. Barras representam a média \pm EPM de 8-15 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste LSD comparando com o grupo controle.

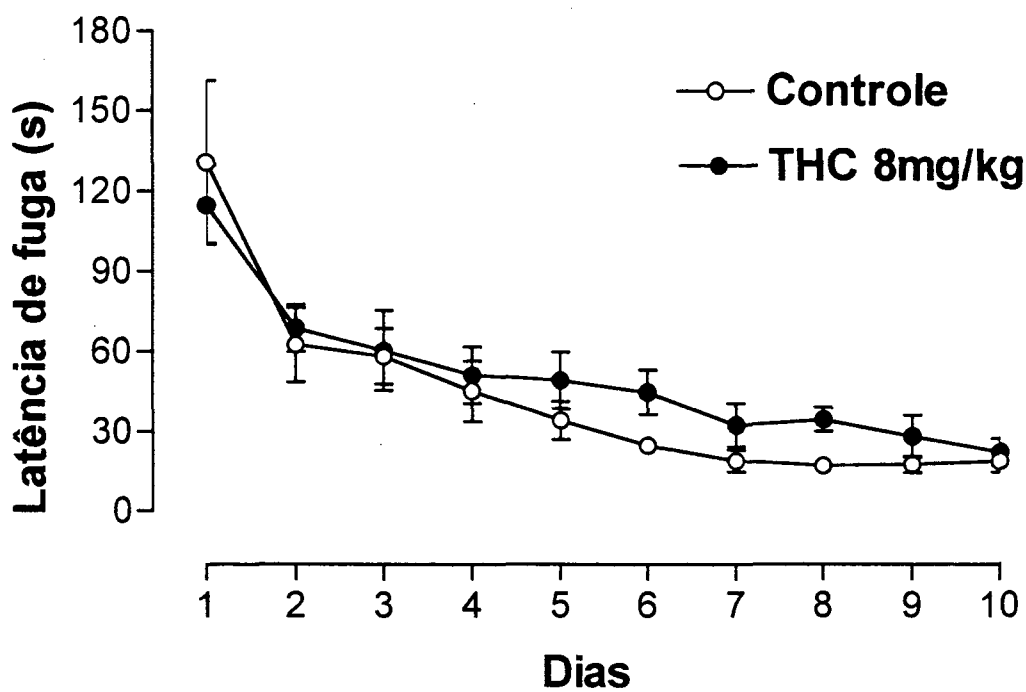


Fig 7. Efeito do Δ^9 -THC sobre a consolidação da memória de referência espacial, para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático. A administração da droga foi realizada todos os dias imediatamente após a sessão. Cada ponto representa a média \pm EPM de 10-12 animais por grupo.

ção dos fatores tratamento e dia não mostrou diferença [$F_{9,180} = 0,484$ $p < 0,8838$]. No tratamento, apesar da análise estatística não ter mostrado diferença significativa foi observado uma tendência no sentido de maior latência de fuga nos animais tratados com Δ^9 -THC a partir do quarto dia, atingindo novamente valores semelhantes ao grupo controle no 10º dia.

A figura 8 mostra o perfil dos animais com relação as linhas cruzadas. ANOVA mostrou apenas um efeito significativo do fator dia [$F_{9,180} = 15,696$ $p < 0,00001$]. O fator tratamento e a interação tratamento/dia não mostraram diferenças significantes [$F_{1,20} = 1,573$ $p < 0,2243$ e $F_{9,180} = 0,334$ $p < 0,9628$, respectivamente].

5.4-Efeito do Δ^9 -THC sobre a retenção da informação espacial previamente aprendida, evocação da memória.

Durante a fase inicial, sem droga, treino espacial, todos os animais aprenderam a encontrar a plataforma escondida, indicado pela diminuição da latência, figura 9. Como apenas no sétimo dia os animais receberam a droga a aplicação de ANOVA não mostrou nenhum efeito significativo do tratamento [$F_{3,24} = 0,05$ $p < 0,9850$], porém como foi visto nos experimentos anteriores ocorreu um efeito significativo do dia [$F_{6,144} = 20,52$ $p < 0,00001$]. A interação dos dois fatores não mostrou efeito significativo [$F_{18,144} = 0,928$ $p < 0,5460$].

O número de linhas cruzadas pelos camundongos, é mostrado na figura 10. Após a administração da droga, no sétimo dia, não ocorreu nenhuma diferença significativa entre os grupos. ANOVA revelou os seguintes valores para o fator tratamento [$F_{3,24} = 0,40$ $p < 0,7544$]; dia [$F_{6,144} = 20,52$ $p < 0,00001$] e interação dia/tratamento [$F_{18,144} = 1,017$ $p < 0,4445$].

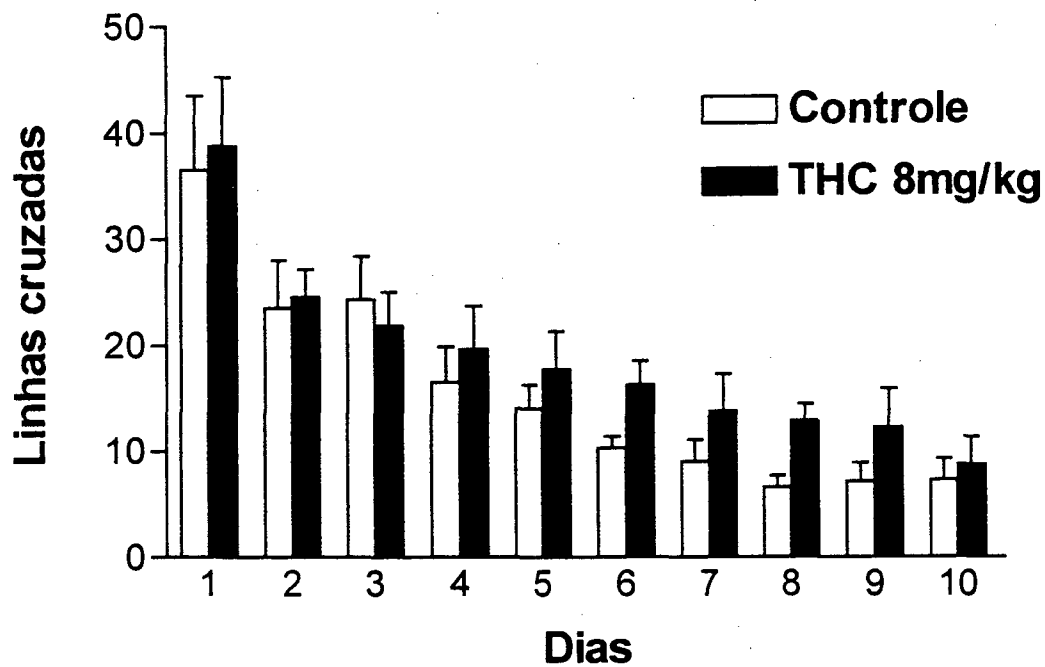


Fig 8. Influência do Δ^9 -THC sobre a capacidade de nado dos animais, expostos a droga após cada sessão. As barras representam a média \pm EPM de 10-12 animais por grupo.

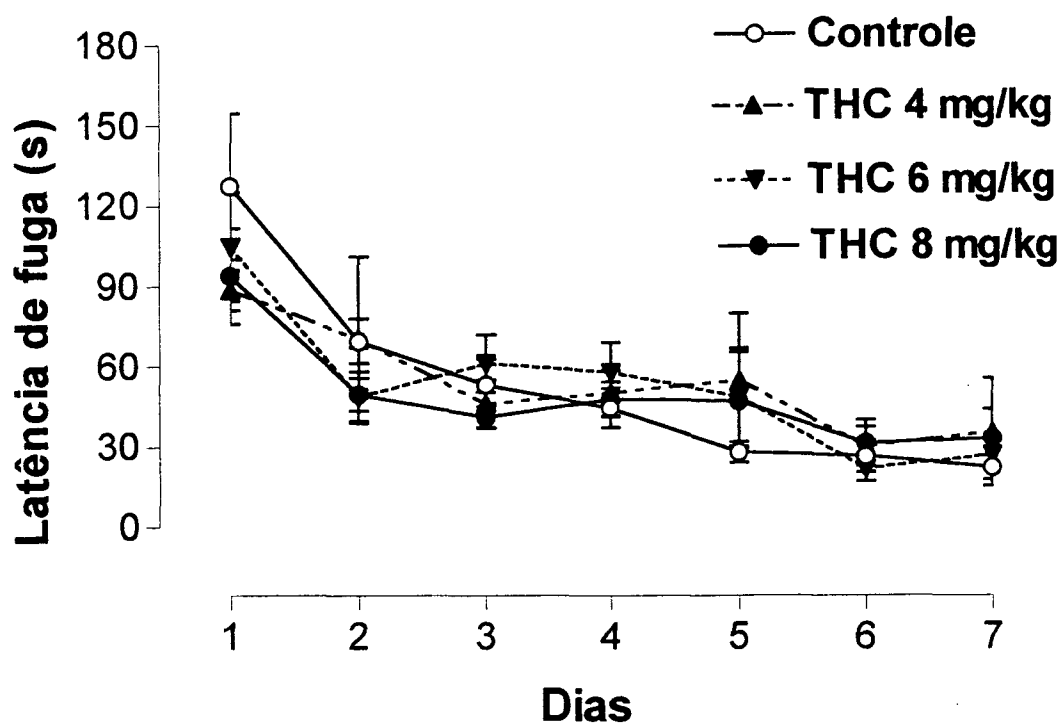


Fig 9. Efeito do Δ^9 -THC, em diferentes doses sobre a evocação da memória de referência espacial, a droga foi injetada 30 min antes da sessão sete. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7 animais por grupo.

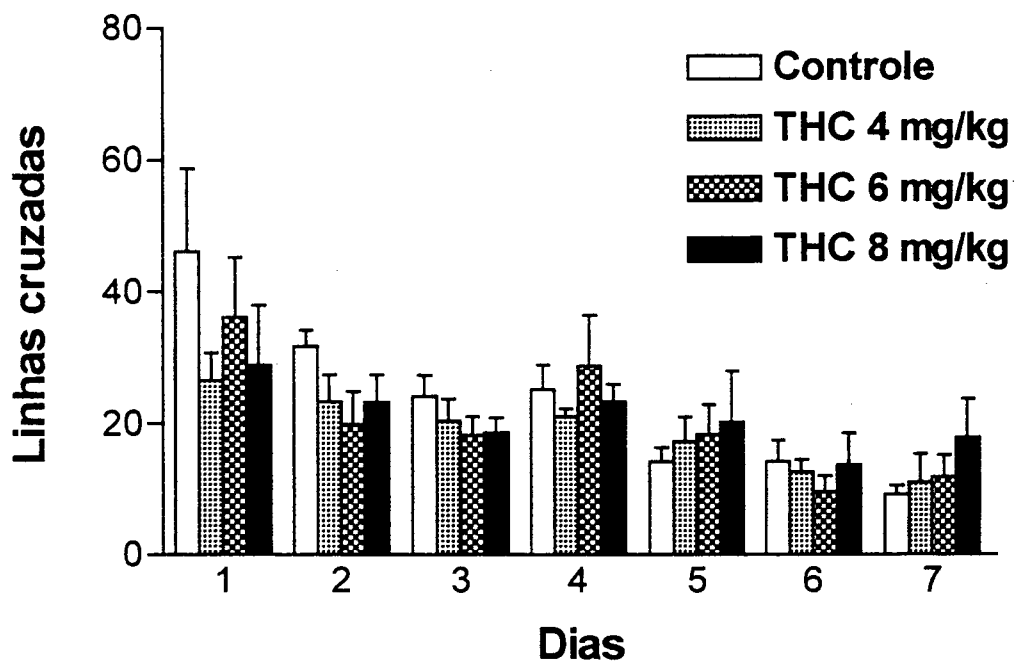


Fig 10. Influência do Δ^9 -THC, em diferentes doses sobre a capacidade de nado dos animais, com administração da droga apenas antes da sessão sete. As barras representam a média \pm EPM de 7 animais por grupo.

5.5-Efeito do Δ^9 -THC sobre a memória operacional

A performance dos camundongos no teste de memória operacional no LAM é mostrado na figura 11. Nesta figura só é mostrado o desempenho máximo do animal antes da aplicação da droga no dia 1 e após aplicação da droga, meia hora antes da sessão, dia 2. ANOVA aplicada aos valores de latência de fuga revelou apenas efeito significativo para o fator dia [$F_{1,13} = 60,459$ $p < 0,00001$], onde pode ser observado um prejuízo na performance no dia 2 em relação ao dia um para ambos os grupos, figura 11 A. O fator tratamento não mostrou efeito significativo [$F_{1,13} = 0,058$ $p < 0,8129$] e a interação tratamento/dia também não foi significativa, [$F_{1,13} = 0,030$ $p < 0,8647$].

Já com relação ao número de linhas cruzadas, figura 11 B, foi observado uma diferença significativa no tratamento, [$F_{1,13} = 4,709$ $p < 0,0491$]; Dessa forma, o grupo que recebeu 8 mg/kg de Δ^9 -THC apresentou maior movimentação. Efeito significativo para o fator dia também foi observado, [$F_{1,13} = 31,121$ $p < 0,0001$], novamente com o grupo controle e tratado apresentando um desempenho pior no dia dois quando comparado ao primeiro dia. Não ocorreu diferença na interação, tratamento/dia [$F_{1,13} = 3,018$ $p < 0,1060$].

5.6 - Avaliação da tolerância do Δ^9 -THC em diferentes doses no aparelho de rotarod

A figura 12 demonstra o efeito de diferentes doses de Δ^9 -THC e seus respectivos grupos controles no aparelho de rota-rod. Apesar das doses serem relativamente altas, comparando, por exemplo, com o experimento no LAM, os animais não demonstraram prejuízo motor até a dose de 28 mg/kg, que levou a um prejuízo motor significativo em relação ao seu grupo controle, teste t $p < 0.01$. Então, nos estudos que se seguiram esta dose foi utilizada.

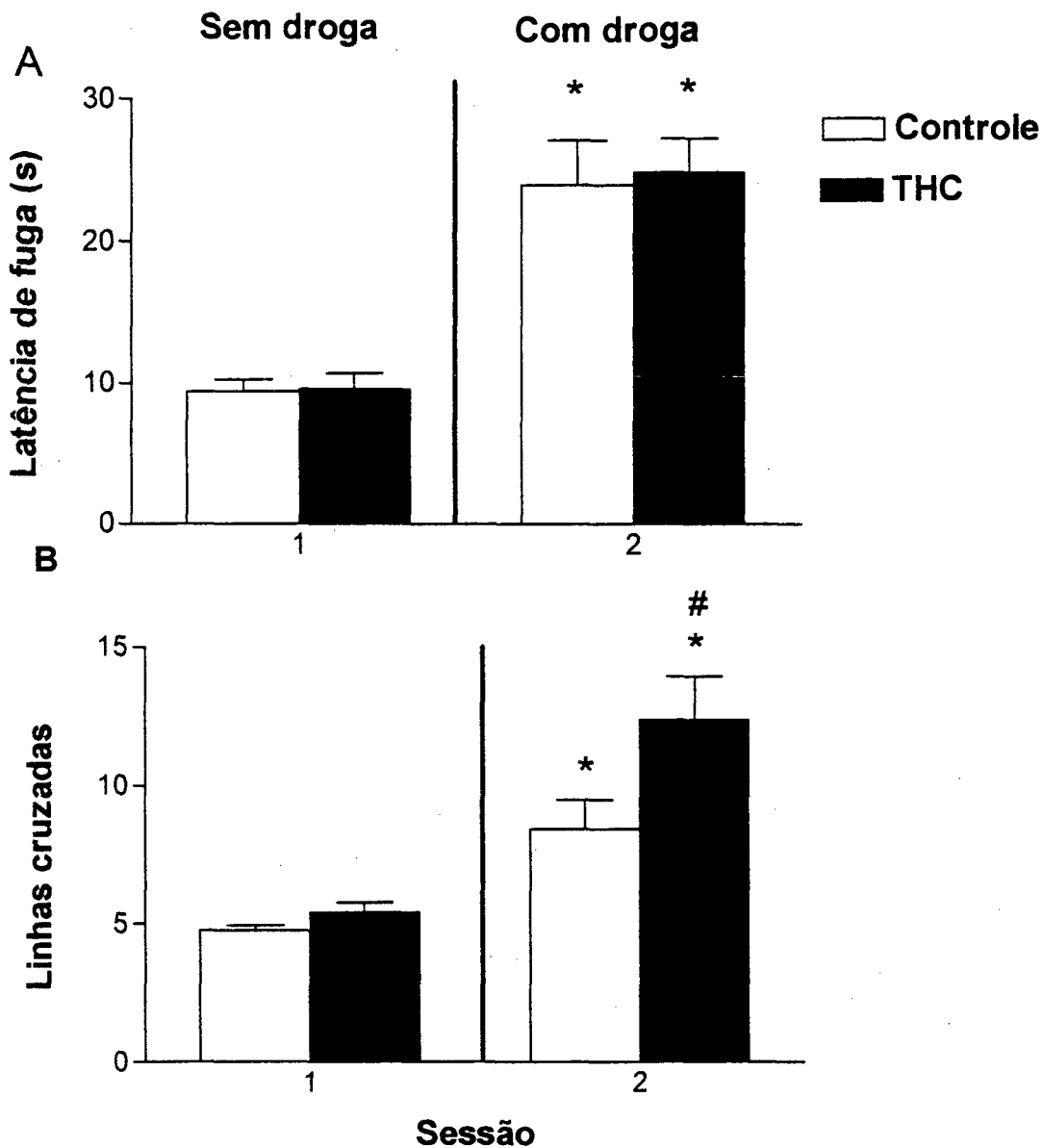


Fig 11. (A) Efeito do Δ^9 -THC 8 mg/kg sobre a memória operacional . (B) influência do Δ^9 -THC 8 mg/kg sobre a capacidade de nado. A droga foi injetada 30 min antes da sessão 2. As barras representam a média \pm EPM de 7-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ teste LSD, diferença entre a sessão 1 e 2. # $p < 0,05$ teste LSD, diferença entre os grupos na mesma sessão.

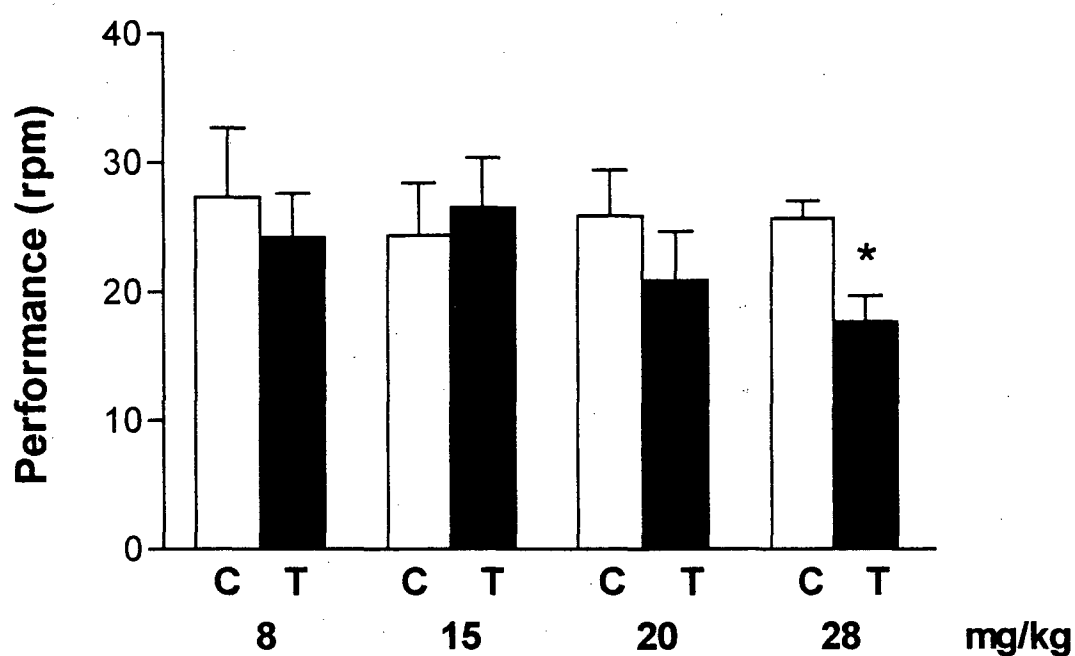


Fig 12. Efeito do Δ^9 -THC, em diferentes doses, sobre a performance motora de camundongos no aparelho de rota-rod. Os animais foram testados 30 min após injeção da droga ou controle. As barras representam a média \pm EPM de 7-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ teste t de student, comparando com o respectivo grupo controle.

5.7- Avaliação do efeito do antagonista SR 141716A em reverter o prejuízo motor no aparelho de rota-rod.

A figura 13, mostra os resultados de diferentes doses do antagonista canabinoide SR 141716A, na investigação da dose apropriada que revertesse o prejuízo motor causado pelo Δ^9 -THC. A aplicação de uma ANOVA de uma via mostrou significativo efeito do tratamento [$F_{4,42} = 6,34$ $p < 0,0004$], análise subsequente através do teste LSD mostrou diferença significativa, $p < 0,01$ para grupos que receberam a dose de 28 mg/kg e foram pré-tratados com controle e Δ^9 -THC em relação ao grupo controle + controle. Já os grupos que foram pré-tratados com SR 141716A 2 mg e 4 mg/kg, mostraram uma diferença significativa, $p < 0,01$ em relação ao grupo Δ^9 -THC. A dose de 1 mg/kg do antagonista não foi capaz de antagonizar, já a dose de 2 mg/kg foi suficiente para impedir o prejuízo da performance. A dose de 4 mg/kg também bloqueou o efeito, porém não diferenciava significativamente da dose de 2 mg/kg. Assim, a dose de 2 mg/kg foi escolhida para antagonizar 28 mg/kg de Δ^9 -THC.

5.8 - Avaliação do efeito do Δ^9 -THC, SR 141716A, etanol e controle na performance de camundongos no rota-rod ao longo do tempo.

A figura 14 mostra o efeito do Δ^9 -THC 28 mg/kg, etanol 2,25g/kg, SR 141716A 2mg/kg e controle em três intervalos de tempo 30, 60 e 90 min onde os animais foram testados no rota-rod. Em termos globais a ANOVA mostrou um efeito significativo para o tratamento [$F_{3,30} = 10,039$ $p < 0,0001$], não encontrando efeito com relação ao tempo [$F_{2,60} = 0,844$ $p < 0,4532$] e interação dos dois fatores [$F_{6,60} = 1,400$]. Assim, ficou claro o maior prejuízo do etanol na performance em relação aos outros grupos. Notou-se também que aos 30 minutos o etanol e Δ^9 -THC produziram maior déficit motor em relação ao grupo controle, $p < 0,0000001$ e

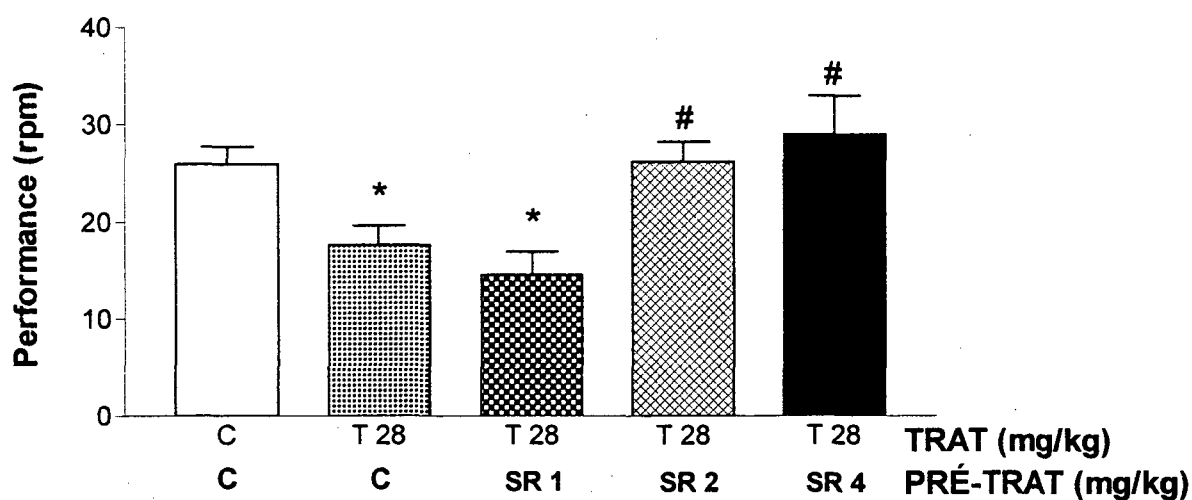


Fig 13. Efeito de diferentes doses do antagonista SR 141716A em reverter o prejuízo motor gerado pelo Δ^9 -THC (28 mg/kg). SR 141716A foi administrado 10 min antes do Δ^9 -THC (T), 30 min depois os animais foram testados no rota-rod. As barras representam as médias \pm EPM de 7-12 animais por grupo. * $p < 0,05$ teste LSD, em relação ao grupo C+C. # $p < 0,05$ teste LSD, em relação ao grupo C + T.

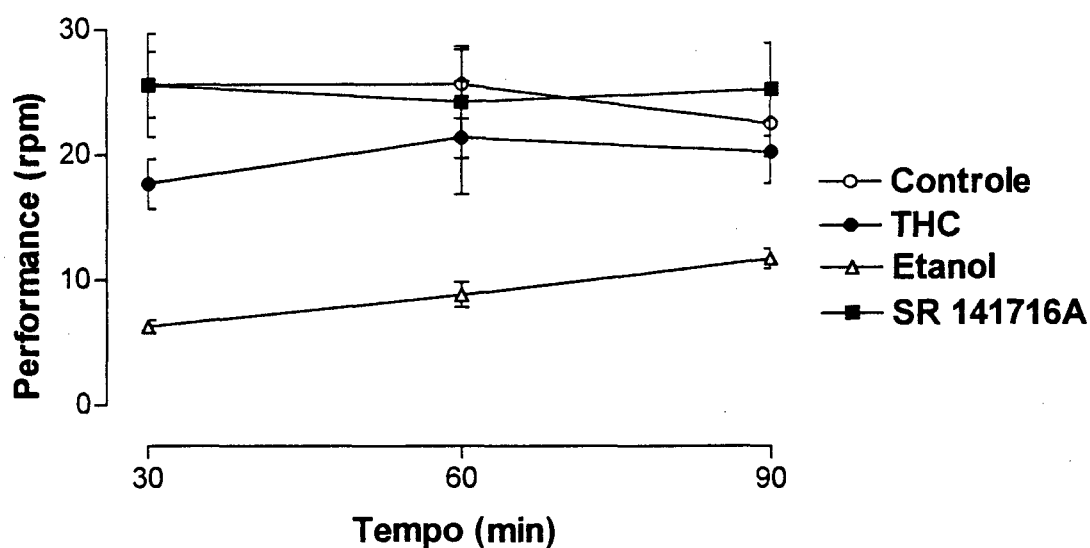


Fig 14. Efeito da administração da solução controle, Δ^9 -THC 28 mg/kg, etanol 2,25 g/kg e SR 141716A 2 mg/kg sobre a performance em camundongos no aparelho de rota-rod ao longo do tempo. Cada ponto representa a média \pm EPM de 7-12 animais por grupo.

$p < 0,00021$ respectivamente, teste LSD. Quanto ao antagonista SR 141716A, não se verificou diferença significativa comparado ao grupo controle.

5.9 – Tolerância rápida para o etanol e Δ^9 -THC e tolerância cruzada entre estas drogas

O desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol e tolerância cruzada para o Δ^9 -THC é mostrado na figura 15. Uma análise de variância de duas vias indicou um significativo efeito do tratamento, [$F_{2,22} = 8,56, p < 0.0018$] e na interação dia tratamento, [$F_{2,22} = 52,05, p < 0.00001$]. Comparação *post hoc* revelou que no dia 1, o etanol induziu significativo prejuízo motor em camundongos comparados com grupo controle (LSD test, $p < 0.05$). No dia 2, o mesmo padrão de resposta foi observado no grupo controle tratado com etanol. Entretanto os animais tratados com etanol ficaram tolerantes ao prejuízo motor induzido pela droga (LSD teste, $p < 0,05$). Tratamento com Δ^9 -THC melhorou significativamente a performance do grupo ET, reduzindo o prejuízo motor causado pelo etanol, fig 15, assim indicando o desenvolvimento de tolerância cruzada rápida ao etanol (teste LSD, $p < 0,05$).

A figura 16 mostra o resultado do experimento sobre o desenvolvimento de tolerância rápida ao Δ^9 -THC. ANOVA de duas vias indicou um significativo efeito do tratamento, [$F_{2,25} = 3,89, p < 0,03$], e a interação do dia tratamento, [$F_{2,25} = 9,98, p < 0,0006$]. Comparação subsequente mostrou que no dia 1, Δ^9 -THC induziu um significativo prejuízo motor em camundongos testados no rota-rod quando comparado com grupo controle (teste LSD, $p < 0,05$). Camundongos pré-tratados com Δ^9 -THC mostraram significativa atenuação do prejuízo motor para dose administrada no dia 2, grupo TT, fig 16 (teste LSD, $p < 0,05$). Isto indica desenvolvimento de tolerância rápida ao Δ^9 -THC. Entretanto não havia tolerância cruzada rápida entre Δ^9 -THC e etanol no dia 2, grupo TE, fig 16.

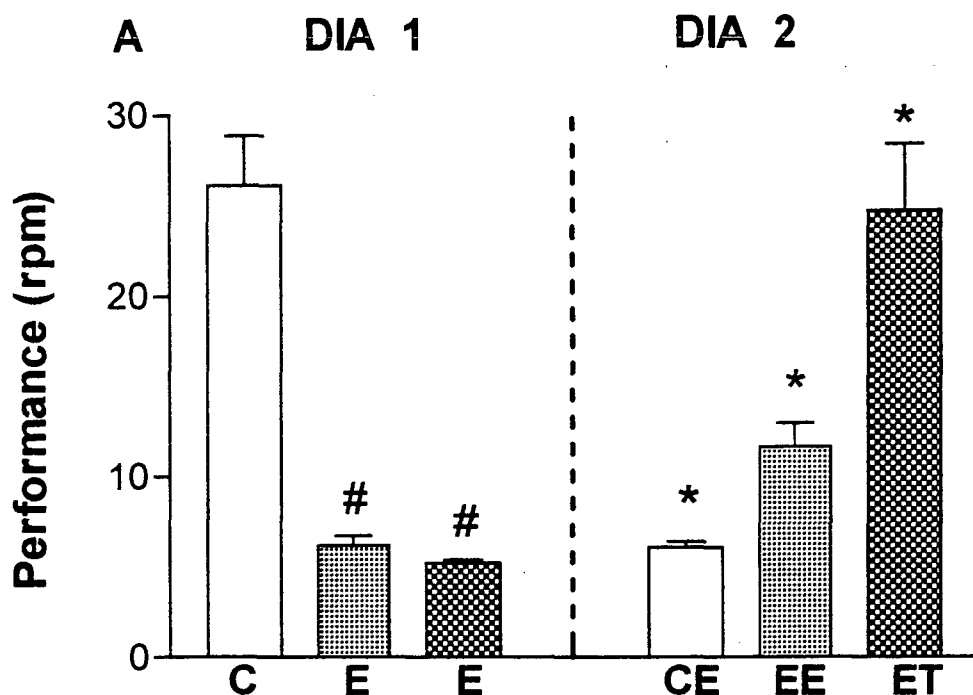


Fig 15. Desenvolvimento de tolerância rápida e tolerância cruzada para o etanol/ Δ^9 -THC baseado na performance no rotarod. No dia 1, um grupo recebeu solução controle (C) e os outros grupos (E) receberam etanol (2,5 g/kg). Animais foram testados 30 minutos depois do tratamento. No dia 2, dois grupos (CE e EE) receberam uma dose de etanol e o outro grupo (ET) recebeu Δ^9 -THC (28 mg/kg), então todos os animais foram testados novamente. As barras representam as médias \pm EPM de 8-10 animais por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ comparação entre o mesmo grupo em relação ao dia 1.

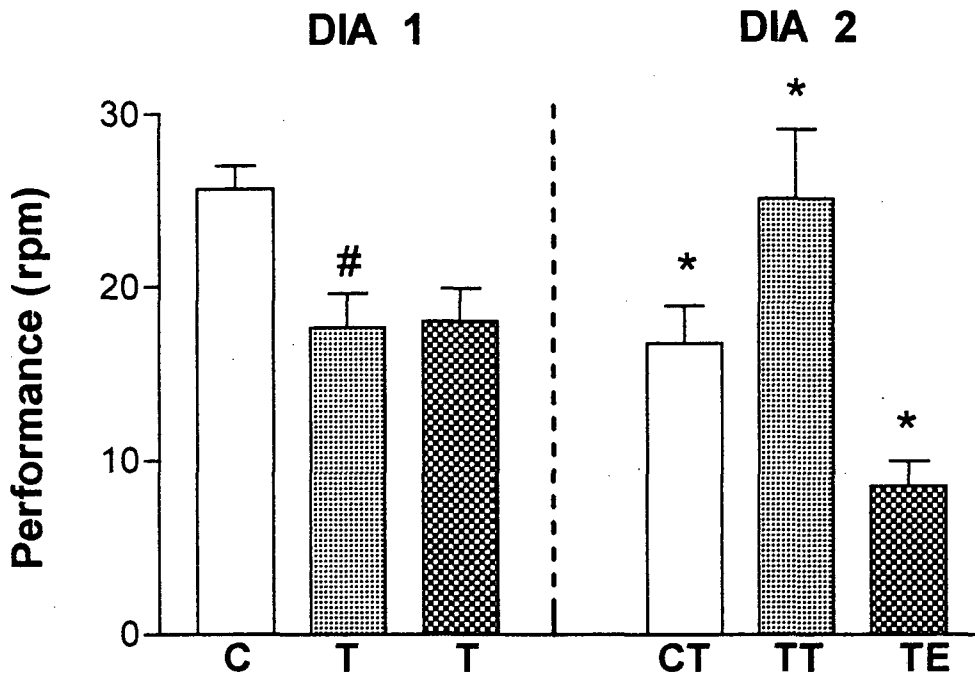


Fig 16. Desenvolvimento de tolerância rápida e tolerância cruzada para o Δ^9 -THC/etanol baseado na performance no rotarod. No dia 1, um grupo recebeu solução controle (C) e os outros grupos (T) receberam Δ^9 -THC (28 mg/kg). Animais foram testados 30 min depois do tratamento. No dia 2, dois grupos (CT e TT) receberam uma dose de Δ^9 -THC e o outro grupo (TE) recebeu etanol (2,25 g/kg), então todos os animais foram testados novamente. As barras representam as médias \pm EPM de 8-10 animais por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ comparação entre o mesmo grupo.

5.10 - Influência do antagonista do receptor CB1 sobre o desenvolvimento de tolerância rápida para o etanol e Δ^9 -THC

A figura 17, mostra a influência do antagonista SR 141716A no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol. Uma ANOVA de duas vias mostrou um significativo efeito para o tratamento [$F_{3,27} = 6,45$, $p < 0,002$]; para o fator dia [$F_{1,27} = 25,33$ $p < 0,00001$] e interação entre os fatores dia e tratamento [$F_{3,27} = 36,96$ $p < 0,00001$]. No dia 1, os animais que receberam etanol (2,25 g/kg), apesar de pré-tratados com SR 141716A (2 mg/kg) ou solução controle mostraram a performance prejudicada sobre o rota-rod, comparando com os respectivos grupos controles (teste LSD $p < 0,05$). A resposta dos animais controle não foi alterada pelo pré-tratamento com SR 141716A. No dia dois, os dois grupos EE mostraram um prejuízo motor significativamente menor para o etanol quando comparado com o dia 1 (teste LSD $p < 0,05$). Neste dia também não foi observado diferença entre o grupo de animais pré-tratados com SR e aquele pré- tratado com solução controle, EE X EE.

Na figura 18 é mostrado a influência do antagonista SR 141716A no desenvolvimento de tolerância rápida ao Δ^9 -THC. ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o tratamento [$F_{3,34} = 3,41$, $p < 0,028$] e para interação dos fatores dia tratamento [$F_{3,34} = 3,70$ $p < 0,02$]. Não ocorrendo diferença significativa no fator dia. No dia 1, comparando com o grupo controle, grupo C, camundongos injetados com Δ^9 -THC, pré-tratada com solução controle, mostraram um significativo prejuízo motor (teste LSD $p < 0,05$). Este prejuízo foi revertido nos animais pré tratados com SR 141716, grupo T. No segundo dia de experimento, o prejuízo motor foi atenuado significativamente em todos os grupos que receberam Δ^9 -THC(TT). O grupo de camundongos injetados com o antagonista SR antes do Δ^9 -THC no dia 1, não mostrou bloqueio na tolerância rápida avaliado no dia 2.

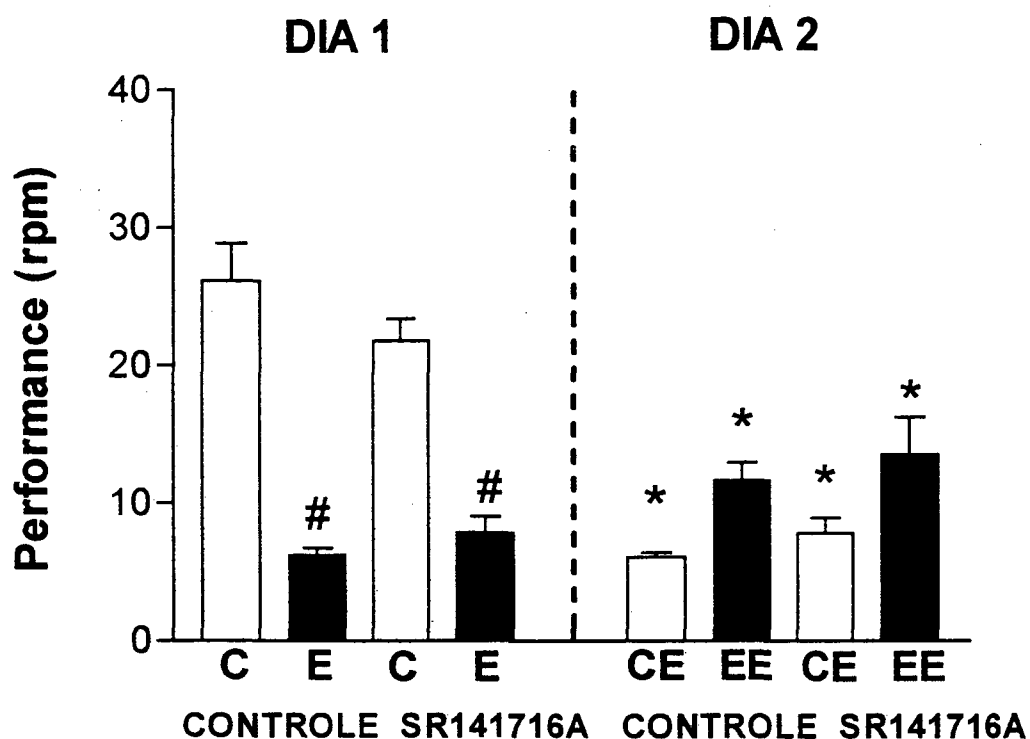


Fig 17. Influência do SR 141716A (2mg/kg) no desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol (2,25 g/kg). No dia 1, o pré-tratamento com solução controle ou SR 141716A foi seguido pela injeção de solução controle (C) ou etanol (E). Trinta minutos mais tarde a performance foi medida no rota-rod. No dia 2, todos os grupos receberam etanol (2,5 g/kg) e foram testados novamente no rotarod. As barras representam as médias \pm EPM de 8-14 animais por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ comparação entre o mesmo grupo.

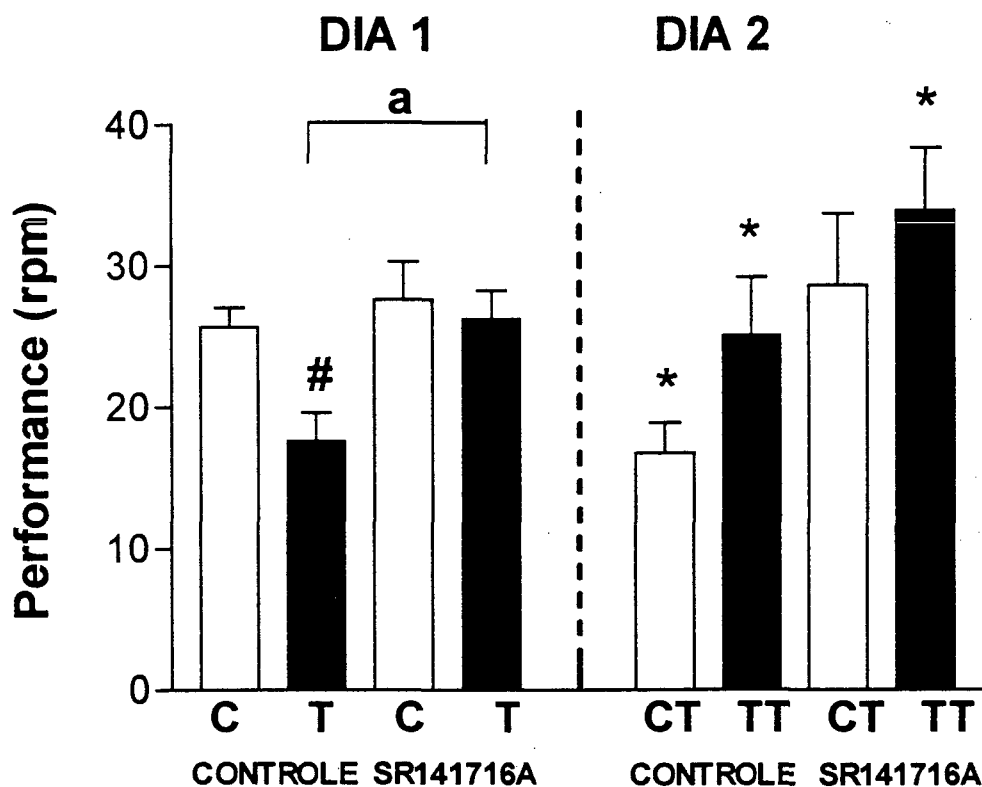


Fig 18. Influência do SR 141716A no desenvolvimento de tolerância rápida ao Δ^9 -THC. No dia 1, o pré-tratamento com solução controle ou SR 141716A foi seguido pela injeção de solução controle (C) ou Δ^9 -THC (T). Trinta minutos mais tarde a performance foi medida no rota-rod. No dia 2, todos os grupos receberam Δ^9 -THC (28 mg/kg) e foram testados novamente no rota-rod. As barras representam as médias \pm EPM de 8-14 animais por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$ comparação entre o mesmo grupo nos dias 1 e 2. a $p < 0,05$ comparando com o respectivo T grupo.

6-DISCUSSÃO

Nos experimentos realizados em camundongos utilizando os dois modelos experimentais, foi demonstrado que são necessárias doses maiores de Δ^9 -THC para levar a um prejuízo significativo na aprendizagem/memória e coordenação motora, no Labirinto Aquático de Morris (LAM) e no rota-rod, respectivamente. Além disso, os resultados sugerem que a tolerância ao Δ^9 -THC pode ocorrer tanto com tratamento prolongado, observado no LAM, quanto com duas aplicações da droga, tolerância rápida, medida no rota-rod.

A menor sensibilidade ao Δ^9 -THC pelos camundongos pode ser observada também em outros experimentos, como o trabalho realizado por Sprague e Craigmil (1976), onde foram utilizadas doses superiores a 15 mg/kg para levar a um prejuízo motor no aparelho de rota-rod. Outro exemplo, é um estudo avaliando a ansiedade experimental, realizado por Onaivi e colaboradores (1990), onde foi demonstrado que doses superiores às administradas em ratos eram necessárias para promover um efeito ansiogênico, no modelo do labirinto em cruz elevado. Pelos dados encontrados, a reduzida sensibilidade à droga deve ser uma característica da espécie.

Na primeira seqüência de experimentos no LAM, com a plataforma fixa numa mesma posição, os resultados obtidos mostraram uma ação distinta do Δ^9 -THC sobre as diferentes etapas do processo de memória. Com sua ação predominante sobre a aquisição da tarefa, ou seja, prejudicando o aprendizado. Mesmo assim, foi necessário uma dose alta de 8 mg/kg..

O fato dos mecanismos cerebrais da memória e aprendizagem estarem também associados aos processos neurais responsáveis pela atenção, percepção, motivação e outros processos neuropsicológicos, sugere que perturbações em qualquer um deles tende a afetar indiretamente

aprendizado e memória. Adiciona-se a isso, a característica da memória de não poder ser observada ou medida diretamente, mas somente analisada sob suas conseqüências, assim sendo, a interpretação dos dados deve ser cautelosa.

Na aquisição da informação, o animal está diante de uma nova situação, então é importante a atenção, que é um processo complexo, com vários componentes como o alerta, a concentração, a seleção, a perscrutação e a exploração (BRANDÃO, 1995). Como existem evidências que o Δ^9 -THC prejudica a atenção (Abel, 1971), em parte de nossos resultados não pode ser descartada a possibilidade do animal não ter sido capaz de direcionar a atenção às pistas que circundam o tanque. Assim, haveria maior dificuldade de elaborar o mapa espacial para a localização da plataforma.

Se o animal estiver com toda a parte sensorial funcionando, visão olfato, audição, e estiver atento às pistas extra labirinto, por um certo período de tempo, associando-as com a plataforma, ele poderá lembrar futuramente a sua localização. Todavia, se ao explorar o ambiente, ele não associar a plataforma a determinadas pistas, ele não lembrará a localização da plataforma. Além disso, o animal, neste caso, pode até vir a usar estratégia de nado, ou seja, não espacial. O animal apenas associará nadar com encontrar a plataforma, não necessitando de pistas, neste caso, a atenção seria irrelevante.

Embora o envolvimento da atenção no processo de aprendizado e memória seja relevante, os estudos realizados em labirintos, como o labirinto radial de 8 braços, onde foram empregadas doses de Δ^9 -THC, enfocam a ação da droga na memória espacial, ou seja atuando sobre o hipocampo. Nesta estrutura, existem células que, diante de situações onde é requerido localização espacial, têm acentuado seus disparos, as chamadas células de lugar. Se a atenção estiver sendo prejudicada, em nosso experimento não é possível quantificar seu papel.

Apesar de nosso trabalho não ter realizado ensaio de união específica para receptor canabinoide, sabe-se que uma das estruturas mais importantes para a memória, o hipocampo, tem alta densidade de receptores canabinoídes CB1 (HERKENHAM, 1991). A ativação destes receptores seria responsável pelo déficit de memória observado no experimento do LAM. Posteriormente, o envolvimento de receptores CB1 foi confirmado com o uso do antagonista canabinoide SR 141716A, que mostrou reverter o déficit encontrado no experimento envolvendo aprendizado.

No hipocampo um dos possíveis mecanismos para perturbação na memória seria a ação sobre PLP ou sobre processos plásticos relacionados com este fenômeno. A ação do Δ^9 -THC e outros canabinoídes sobre a formação de PLP já foi observada em vários experimentos (NOWICKY et al, 1987; COLLINS et al., 1994; TERRANOVA et al., 1995).

Não necessariamente o déficit estaria relacionado a ação direta sobre os receptores CB1. É possível que este receptor modularia negativamente no hipocampo a liberação de glutamato em neurônios glutamatérgicos da região CA1 e CA3, e liberação de acetilcolina de neurônios colinérgicos da via perforante septohipocampal no giro dentado. Além do hipocampo, CB1 nas camadas moleculares corticais, também modularia a liberação de glutamato (DiMARZO et al. 1998).

No estudo da memória, o envolvimento da acetilcolina (ACh) não pode ser ignorado. Várias evidências indicam que a ACh no córtex medial pré-frontal e hipocampo está envolvida em processos relacionados com cognição como despertar, atenção, aprendizado e memória (DELACOUR et al. 1990; PENTILLA et al. 1985; RIEKKINEN et al. 1991; SIMON e EMMONS, 1956). Desta forma a administração de drogas anticolinérgicas ou lesão por neurotoxinas em neurônios colinérgicos do hipocampo ou corticais prejudicam a performance

em testes de aprendizado e memória (FIGIBER, 1991). Apesar do Δ^9 -THC e antagonistas muscarínicos prejudicarem a memória, a ação perturbadora ao menos com relação a memória espacial não parece se dar pela mesma via. Para investigar a relação entre canabinóides e neurônios colinérgicos no prejuízo da memória, Lichtman e Martin (1996) administraram o antagonista SR141716A em animais para tentar reverter o efeito da escopolamina, um anticolinérgico conhecido por sua capacidade amnésica. De outra maneira, eles administraram Δ^9 -THC para prejudicar a capacidade do animal no labirinto e tentaram reverter o prejuízo com fisostigmina, um anticolinesterásico. Em ambos os casos o prejuízo persistia, indicando assim, uma ação por vias distintas, mas não descartando que poderia envolver uma terceira via, como a dopaminérgica.

Durante o estudo do efeito do Δ^9 -THC no aprendizado, notou-se uma redução do efeito da droga com o tempo. Tal resultado se encaixaria dentro do fenômeno de tolerância, fato relativamente comum quando se faz aplicação contínua de certas drogas. Entretanto, não é possível descartar a habituação do animal com a tarefa. Nesta situação, o animal não mais estaria na dependência do hipocampo. Como decorre um período de 24 h entre uma sessão e outra, este tempo poderia ser suficiente para levar a um fortalecimento da memória, ou seja, a permissão da passagem da informação do hipocampo para sistemas de memória distribuídos por diversas áreas do córtex cerebral.

Como já foi mencionado, a consolidação da memória envolve o fortalecimento das informações que o animal vem adquirindo. Inúmeros trabalhos demonstram que esta etapa também é susceptível a ação de drogas. Tratamentos efetuados imediatamente ou pouco depois da aquisição de determinadas memórias podem alterar as memórias adquiridas recentemente (MAcGAUGH e HERZ, 1972).

É importante lembrar que o aprendizado prejudicado não significa que o animal foi incapaz de realizar a tarefa, mas que, quando sob o efeito da droga, ele aprende sobre a localização da plataforma mais lentamente, o tempo gasto no aprendizado é maior. Sendo assim, a cada dia este aprendizado pode se fortalecer, isso não acontece se a tarefa e o tempo forem alterados, como verificado por Nakamura e colaboradores (1991) utilizando um protocolo de memória operacional no LAM.

Um procedimento utilizado para verificar a ação do Δ^9 -THC sobre a consolidação da informação adquirida, e esclarecer se a droga permitiria a passagem da informação para memória de longa duração, com a possibilidade da habituação, foi a administração da droga imediatamente após cada sessão. Dessa forma, a tolerância também seria verificada. Neste caso, envolveria a chamada tolerância comportamental. Os nossos resultados indicam não haver prejuízo na consolidação da informação, já que 24 h depois os animais lembraram a localização da plataforma. Assim, existe a possibilidade de estar ocorrendo habituação ou tolerância, seja ela comportamental ou celular, já que a dose é relativamente alta.

O fato do animal não passar pela sessão sob efeito da droga como no último experimento mencionado, poderia impedir ao menos a tolerância comportamental, onde como já destacado o animal aprende a “lidar” com o efeito da droga durante a performance, melhorando mais rapidamente seu desempenho. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e Δ^9 -THC, apenas uma tendência deste último grupo em apresentar latência maior, o que não descartaria totalmente o envolvimento deste tipo de tolerância.

A última etapa do processo de memória a ser investigado foi a evocação, lembrança da experiência pelo qual o animal passou e aprendeu. No presente estudo, Δ^9 -THC foi aplicado após os animais serem treinados durante uma semana no LAM e atingirem um grau máximo de

aprendizado. O tratamento não demonstrou qualquer efeito sobre a performance dos animais. Como já visto na literatura (ABEL, 1971), a evocação pode não ser afetada pelo Δ^9 -THC, principalmente neste caso onde a memória envolvida é de longo prazo. Nesta situação a informação adquirida não depende exclusivamente do hipocampo, mesmo que ele tenha um papel importante no aprendizado espacial. É importante ressaltar que no trabalho utilizando o labirinto radial de oito braços foi verificada a incapacidade do Δ^9 -THC em afetar a memória de referência espacial (NAKAMURA et al., 1991), que é compatível em humanos a memória procedural ou hábito, confirmando nossos resultados.

O animal, ao ser colocado no tanque, primeiramente aprende que a plataforma é a única maneira da fuga da água. No procedimento para acessar a memória operacional no LAM, além da associação fuga/plataforma é necessário aprender a regra que, uma vez encontrada a plataforma, ela sempre estará na mesma posição durante subseqüentes ensaios da sessão, dessa forma, a memória de longo prazo é a envolvida. Entretanto, a organização da informação espacial quando o animal entra em contato pela primeira vez com a plataforma na sessão está relacionada a memória de curto prazo.

Com relação a memória operacional os presentes resultados foram inesperados, tanto os animais do grupo Δ^9 -THC quanto controle mostraram uma performance prejudicada, avaliados através da latência de fuga. Observando o número de linhas cruzadas, e o grupo Δ^9 -THC foi verificado um pior desempenho em relação ao grupo controle. Isto é relevante porque as linhas cruzadas além de servirem como medida de atividade motora do animal podem indicar também o quanto ele procurou a plataforma e é independente da velocidade de nado que poderia estar sendo influenciada pelo estresse da aplicação da droga ou salina. Klapdor e Staay (1998) em experimentos com camundongos no LAM, devido a uma influência na velocidade de nado

sobre a latência de fuga, preferiram usar o número de linhas cruzadas como medida de capacidade de memória. Considerando a justificativa acima, então poderia ser dito que o Δ^9 -THC afetou a memória operacional. O que confirma os estudos anteriores, utilizando o labirinto radial de oito braços, onde o prejuízo neste tipo de memória em ratos já havia sido bem estabelecido (KALANT e STIGLICK, 1982; NAKAMURA et al., 1991; LICHTMAN et al., 1995; MOLINA-HOLGADO, F. et al., 1995).

Apesar de camundongos serem animais menos usados do que ratos no LAM, a capacidade de localizar a plataforma neste modelo, ao longo das sessões é clara. No entanto, quando eles recebem a injeção temos uma situação nova e aversiva para o animal, que treinou sem nenhuma administração da droga, isto pode então desencadear uma resposta maior de fuga no tanque para ambos os animais independente do tratamento, droga ou veículo. Foi observado que, apesar do tempo para encontrar a plataforma ser o mesmo, o número de linhas cruzadas pelos animais é diferente. Para o grupo controle, o estresse pode não ter prejudicado diretamente a memória, mas a própria concentração no objetivo para a fuga do estressor. Então o animal no primeiro momento dispararia ao acaso, porém logo lembraria que a plataforma é a única saída. Por isso o número de linhas cruzadas foi menor. Enquanto que no caso do Δ^9 -THC o animal nadaria mais ao acaso, procurando outra saída, que não a plataforma.

Pelo fato do Δ^9 -THC ter efeito ansiogênico em camundongos (ONAIIVI et al. 1990) e a dose utilizada aqui ser capaz de produzir este efeito, mesmo sem a quantificação ela não pode ser desconsiderada. Na água, o camundongo se encontra em situação aversiva, necessita então escapar, encontrar a plataforma, dessa forma o fator ansiedade faria o animal intensificar a procura pela plataforma utilizando muito pouco a memória de referência espacial e mais

movimentos ao acaso, podendo assim tanto encontrar a plataforma rapidamente quanto de maneira mais demorada.

Na série de experimentos realizados no LAM com camundongos albinos, poderia se argüir que esta espécie não é adequada para o teste pois são oriundos de lugares secos e com aversão a água. Entretanto, na situação experimental, onde o animal é colocado diretamente em contato com estímulo aversivo, a água, o animal vai tentar uma maneira de conseguir escapar. Neste caso, a única saída é a plataforma, então o animal acaba associando-a como único meio para livrar-se da água, e os dados mostram que de fato os animais aprendem.

Vários estudos têm mostrado que os canabinóides suprimem a atividade locomotora (MARTIN, et al., 1981; COMPTON et al., 1991) e induzem catalepsia (GOUGH e OLLEY, 1977; PERTWEE et al., 1988). Embora a base anatômica do efeito motor de canabimiméticos seja incerta, tem sido sugerido o envolvimento de mecanismos do gânglio basal. Dentro do gânglio basal, receptores CB1 têm sido identificados sobre neurônios de projeção estriatal. Assim, estes achados sugerem que os canabimiméticos produzem efeito motor pela estimulação do receptor CB1 no gânglio basal. Sendo que o Δ^9 -THC diminui a locomoção espontânea, poderia ser argüido que o prejuízo no teste do LAM, no experimento de aquisição, não estaria relacionado com a memória, entretanto várias observações indicam que o prejuízo canabinóide na performance pode ser dissociado da inibição da atividade locomotora.

Experimentos utilizando 10 mg de Δ^9 -THC em camundongos albinos demonstraram diminuição em 70 % na atividade espontânea (DEWEY, et al. 1970), porém nesta situação os animais não se encontram em ambiente aversivo, portanto sem necessidade de esquivar-se, por exemplo de um choque, ou em nossa situação, a água. No LAM, o fato do animal ser colocado na água já geraria um comportamento diferente, neste caso o nado. Com isso pode ser

verificado que na água a aplicação da droga levou a um estímulo na movimentação. Os fatores que proporcionaram a movimentação, estímulo motor, ansiedade, estresse não ficaram definidos.

A investigação da tolerância na segunda seqüência de experimentos com o aparelho de rota-rod mostrou primeiramente que são necessárias em camundongos, doses maiores que 20 mg/kg para levar a um prejuízo motor, que só foi significativo com a dose de 28 mg/kg. Sprague e Craigmill (1976) usando doses um pouco menores também encontraram prejuízo motor com o mesmo aparelho, todavia, no procedimento por eles realizado a velocidade de rotação do cilindro permanecia fixa, enquanto no presente trabalho a velocidade de rotação aumentava com o tempo, exigindo cada vez mais coordenação motora do animal.

Assim como já relatado para o etanol (KHANNA et al., 1996), nossos resultados confirmam que a tolerância ao prejuízo motor pelo Δ^9 -THC pode ser obtido com apenas duas exposições a droga. Mesmo o canabinóide não produzindo um efeito tão acentuado sobre a performance, como o etanol, a dose utilizada produziu tolerância rápida. Esta dose foi escolhida baseada no trabalho de Sprague e Craigmill (1976), onde eles mostraram que a dose de 1,35 g/kg equivaleria a 17 mg/kg de Δ^9 -THC. Outros experimentos demonstraram que a dose de 2,25 g/kg de etanol é suficiente para produzir tolerância rápida, desta maneira foi escolhida a dose de 28 mg.

A diferença de prejuízo produzido pelas duas drogas foi nítida e a semelhança ou equipotência esperada não ocorreu como pode ser notado nos nos gráficos dos experimentos envolvendo tolerância rápida e cruzada. É possível que este fato seja resultado do procedimento experimental, como já colocado, diferença entre rotação fixa e com aceleração contínua. Outra possível razão é que a droga, possuindo um efeito ansiogênico (ONAIVI et al.,

1990) geraria maior medo no animal, mantendo-se por mais tempo no aparelho, evitando a queda. O quanto o fator ansiedade influenciaria esta associação aprendida, queda-choque, na habilidade dos animais poderia ser investigado.

Utilizando o mesmo protocolo de dois dias, a tolerância cruzada rápida foi encontrada. No primeiro dia, quando os animais receberam etanol, mostraram um acentuado prejuízo motor. No dia seguinte, neste mesmo grupo foi injetado Δ^9 -THC e o resultado foi um efeito não significativo deste último. Parece que a administração de uma droga com maior capacidade de prejuízo, como o etanol, que produz incoordenação motora, quando injetada previamente a uma droga de menor potência, como o Δ^9 -THC, geraria uma adaptação, tolerância, de tal forma no organismo que a segunda droga não seria capaz de compensar.

Quando o tratamento contrário do anterior foi realizado, ou seja, no primeiro dia os animais receberam Δ^9 -THC e no segundo dia etanol o mesmo fenômeno de tolerância não ocorreu. O etanol continuou a prejudicar o desempenho. Pode-se dizer então que a característica da tolerância é assimétrica.

A assimetria da tolerância cruzada sugere que Δ^9 -THC e etanol induzem tolerância por mecanismos diferentes. O resultado encontrado está dentro da variabilidade descrita em estudos prévios, os quais na maioria dos experimentos encontraram tolerância cruzada simétrica entre as duas drogas (SIEMENS e DOYLE, 1979; NEWMAN et al., 1974; SPRAGUE e CRAIGMILL, 1976). Entretanto, outros investigadores (KALANT e LE BLANC, 1974), medindo a performance de ratos sobre uma esteira em movimento, como índice do efeito da droga, encontraram resultado similar ao nosso experimento, tolerância assimétrica. Estes dados também confirmam estudos recentes sobre tolerância rápida cruzada entre etanol e algumas drogas sedativas/hipnóticas (KHANNA et al., 1991).

Conforme descrito na introdução, quando se está estudando o fenômeno de tolerância, seja ela crônica ou rápida, a questão farmacocinética nunca pode ser desconsiderada no desenvolvimento de tolerância, pois claramente é responsável pelo que acontece com muitas drogas depressoras como os barbitúricos, onde ocorre uma estimulação a nível enzimático.

No presente trabalho a não realização da dosagem sanguínea de Δ^9 -THC e seus metabólitos e do etanol, é justificada pelos estudos prévios que não conseguiram demonstrar bases farmacocinéticas para tolerância rápida ao Δ^9 -THC (PERTWEE et al., 1995) e ao etanol (CRABBE et al., 1979) e tolerância cruzada entre Δ^9 -THC e etanol (SIEMENS e DOYLE, 1979; SPRAGUE e CRAIGMILL, 1976), indicando que o fenômeno é farmacodinâmico.

Siemens e Doyle (1979), utilizando ratos, mostraram que animais tolerantes ao Δ^9 -THC, após administração i.v. de ^{14}C THC, não apresentavam alterações na distribuição tecidual, na ligação a proteínas plasmáticas ou na razão de metabolismo e excreção do ^{14}C THC. Em experimento realizado com camundongos, Sprague e Craigmill (1976) administrando ^3H THC i.p., verificaram também nestes animais que a tolerância não resultava de estimulação de metabolismo hepático ou mudanças na proporção desta droga no cérebro.

Fonseca e colaboradores (1994) mostraram significativa redução do número de receptores canabinóides no estriado, sete dias após o tratamento diário com Δ^9 -THC. Em recente experimento, para investigar a influência da exposição crônica ao etanol e funcionamento do receptor CB1, Basavarajappa e Hungund (1999) sugerem que o etanol não só leva uma *down-regulation* dos receptores canabinóides, já demonstrado por outros pesquisadores, mas também uma ação sobre o funcionamento do receptor, ou seja, o etanol estaria perturbando a via de transdução de sinal a nível de proteína G.

Neste estudo, portanto, não é possível fazer maiores considerações a respeito do papel relativo dos fatores farmacodinâmicos versus farmacocinéticos, para a tolerância rápida e tolerância cruzada para o etanol e o Δ^9 -THC. Entretanto, pelas evidências mencionadas, seria razoável esperar que o pré-tratamento com o antagonista SR 141716A, ao inibir o prejuízo motor gerado pelo Δ^9 -THC, previniria o aparecimento de tolerância. No caso do etanol, se algum efeito deste estivesse relacionado com o receptor canabinoide, como já relatado (BASAVARAJAPPA et al., 1998; COLOMBO et al., 1998), alguma alteração no prejuízo motor seria evidenciada.

No presente trabalho, após ter sido verificada que a dose de 2 mg/kg do antagonista revertia o prejuízo motor gerado pela dose de 28 mg/kg de Δ^9 -THC, foi verificada sua influência na tolerância. Um resultado inesperado ocorreu. O pré-tratamento com o antagonista não bloqueou a tolerância rápida induzida pelo Δ^9 -THC. Além disso, os camundongos injetados com o antagonista no dia anterior mostraram tendência a uma tolerância aumentada, depois da injeção de Δ^9 -THC no dia 2.

Uma possibilidade para explicação da tolerância rápida estaria relacionada com o aprendizado que é um fator praticamente inerente a tolerância. Um grande número de estudos nas últimas décadas têm enfatizado a importância da experiência ou história ambiental prévia relacionada a exposição da droga em determinar os tipos e intensidades de tolerância observada após a administração repetida da droga (CHEM, 1972; COCHIN e KORNETSKY, 1964).

A possibilidade do envolvimento do fator aprendizado poderia então explicar a tolerância rápida ao Δ^9 -THC, no entanto, os animais que receberam o antagonista não foram testados no rota-rod sob efeito da droga, portanto, não podem ter aprendido a adaptarem-se aos efeitos da

droga. Ainda relacionado ao aprendizado, em experimento investigando a memória social o SR 141716A apresentou propriedade em acentuar a memória (TERRANOVA et al., 1996).

A utilização de antagonistas NMDA poderia talvez elucidar o envolvimento do aprendizado nos resultados. Desde que estes receptores têm sido considerados importantes na aprendizagem/memória, não seria surpresa que algum antagonista NMDA bloqueasse a tolerância aprendida. Trabalhos publicados (KHANNA et al., 1997; BARRETO et al., 1998) verificaram que antagonistas deste receptor inibem o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol. Já que os receptores NMDA parecem sofrer ação direta ou indireta de canabinóides seria interessante verificar esta possibilidade.

A performance observada no segundo dia do animal tolerante ao Δ^9 -THC e que recebeu SR 141716A (2 mg/kg) no primeiro dia pode ter sido influenciada pelo longo tempo de ação da droga. Em um estudo pioneiro, realizado por Rinaldi-Carmona e colaboradores (1994), a administração oral de SR141716A (3 mg/kg) reverteu a hipotermia induzida pelo agonista canabinóide WIN- 55212-2 com uma diferença significativa em relação ao controle pr pelo menos 18 h.

Como o experimento com o aparelho de rota-rod envolve processo motor, a possibilidade de um estímulo motor já relatada para a droga por Compton e colaboradores (1992), poderia também ter sua influência sobre o desempenho, porém parece que isto não ocorre, já que a administração da droga isoladamente, mesmo na dose de 4 mg/kg, não proporcionou nenhuma mudança na performance.

Neste estudo, não pode ser desconsiderado a complexa farmacologia de alguns canabinóides: Δ^9 -THC tem sido reportado como um agonista parcial (BURKEY et al., 1997), enquanto outros estudos demonstram uma ação de antagonista para o Δ^9 -THC, após altas

doses da droga (PETITET et al., 1998). Mesmo que esta última hipótese fosse possível, no presente experimento com o rota-rod, a performance não deveria melhorar, e sim permanecer semelhante ao grupo controle.

Em termos especulativos as doses altas de Δ^9 -THC e SR 141716A, as quais foram expostos os receptores, poderiam levar a uma alteração dos mesmos, ou em mecanismos de transdução, os quais no segundo dia ‘permitiriam’ uma ação tipo agonista inverso do Δ^9 -THC, como ocorre com o próprio antagonista SR 141716A.

Desde que é conhecido que a prática sobre a influência de etanol é um importante fator na indução de tolerância rápida (BITRAN e KALANT, 1991) e envolve processos relacionados a aprendizado e memória e as sugestões que este tipo de tolerância é um previsor de tolerância crônica, é aceitável que similar hipótese poderia ser estendida ao Δ^9 -THC. De fato, os presentes achados confirmam e estendem o trabalho de Pertwee e colaboradores (1993), que demonstraram o desenvolvimento de tolerância rápida para a ação hipotérmica do Δ^9 -THC e de outros estudos descrevendo tolerância crônica seguido do Δ^9 -THC (SPRAQUE e CRAIGMILL, 1976; SIEMENS e DOYLE, 1979). Assim, como colocado por Khanna e colaboradores (1991)” se outras manipulações são conhecidas por afetar a tolerância crônica, de maneira similar, a tolerância rápida pode ser uma ferramenta útil, barata e rápida para examinar tolerância em geral”. Este tipo de abordagem se verdade, poderia oferecer várias vantagens: o tratamento crônico tem um custo muito mais alto do que com apenas duas doses; a própria administração repetida da droga pode levar a um efeito deletério no animal; também deve-se observar o efeito tóxico.

O presente estudo mostrou que camundongos são susceptíveis aos efeitos do Δ^9 -THC no LAM, e o prejuízo se dá predominantemente no aprendizado, sendo a lembrança da tarefa não

alterada. A ação observada do Δ^9 -THC parece ser mediada pelo receptor CB1, provavelmente no hipocampo. Desta forma SR 141716A foi capaz de reverter o prejuízo.

Finalmente, os resultados dos experimentos onde foi utilizado o aparelho de rota-rod, mostraram que a tolerância rápida ao prejuízo motor se desenvolvia quando doses elevadas de Δ^9 -THC eram administradas em camundongos. A tolerância cruzada rápida se desenvolveu apenas para o Δ^9 -THC, quando o animal era exposto 24 h antes ao etanol. O antagonista SR 141716A não impediu o desenvolvimento de tolerância rápida para o Δ^9 -THC, sugerindo um mecanismo onde os receptores CB1 não seriam tão importantes, mecanismo este, que seria diferente daquele encontrado na tolerância crônica, onde alterações nos receptores são evidenciadas.

7-CONCLUSÕES

- No experimento para avaliar memória de referência, no Labirinto aquático de Morris, com a plataforma fixa em uma mesma posição ao longo das sessões, o Δ^9 -THC prejudicou a aquisição da tarefa de maneira dose dependente, não afetando a consolidação nem a evocação da informação aprendida.
- O receptor envolvido no prejuízo da performance no Labirinto Aquático de Morris parece ser o receptor canabinóide CB1, pois o antagonista canabinóide SR 141716A reverteu o prejuízo.
- No teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris parece que o Δ^9 -THC também prejudica este tipo de memória.
- Como para o etanol, tolerância rápida ao prejuízo motor no aparelho de rota-rod também ocorre para o Δ^9 -THC.
- O antagonista SR 141716A não impediu o desenvolvimento de tolerância cruzada rápida para o Δ^9 -THC e etanol.
- A tolerância rápida cruzada para o etanol e Δ^9 -THC não foi simétrica. Δ^9 -THC não proporcionou o desenvolvimento de tolerância rápida cruzada para o etanol.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, E.L. Marijuana and memory: acquisition or retrieval? *Science* 173, 1038-1040, 1971.
- ABOOD, M.E.; MARTIN, B.R. Neurobiology of marijuana abuse. *TIPs* 13:201-206, 1992.
- AIGNER, T.G. Delta-9-tetrahydrocannabinol impairs visual recognition memory but not discrimination learning in rhesus monkeys. *Psychopharmacol* 95:507-511, 1988.
- ANDERSON, P.F.; JACKSON, D.M.; CHESHER, G.B.; MALOR, R. Tolerance to the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in mice on intestinal motility, temperature and locomotor activity. *Psychopharmacol* 48:31-36, 1975.
- BADDELEY, A. *Working Memory* (oxford Univ. Press, London). 1986.
- BARNES, C. A. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *TINs*, 11(4):163-169, 1988.
- BARRETO, P.S.; LEMOS, T.; MORATO, G.S. NMDA-receptor antagonists block the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Addiction Biology* 3:55-64, 1998.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; COOPER, T.B.; HUNGUND, B.L. Chronic ethanol administration down regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Res* 793:212-218, 1998.
- BASAVARAJAPPA, B.S.; HUNGUND, B.L. Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S]GTPγS binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. *Brain Res* 815:89-97, 1999.
- BELMORE, S.M.; MILLER, L.L. Levels of processing and acute effects of marijuana on memory *Pharmacol Biochem Behav* 13:199-203, 1980.
- BITRÁN, M.; KALANT, H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav* 39:917-922, 1991.
- BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356, 1973.
- BONNIE, R.J.; WHITEBREAD II, C.H. *The marijuana conviction: A history of marijuana prohibition in the United States*. Charlottesville, V.A.: University Press of Virginia, 1974.
- BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia*, São Paulo, Atheneu, 1995.

- BURES, J.; FENTON, A.A.; KAMINSKY, Y.; ZINYUK, L. Place cells and place navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:343-350.
- BURKEY, T.H.; QUOCK, R.M.; CONSROE, P.; ROESKE, W.R.; YAMAMURA, H.I. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol is a partial agonist of cannabinoid receptors in mouse brain. *Eur J Pharmacol* 323:R3-R4, 1997.
- CARLINI, E. A. Tolerance to chronic administration of *Cannabis sativa* (marihuana) in rats. *Pharmacol* 1, 135, 1968.
- CARLINI, E.A. Maconha (*Cannabis sativa*): da "erva de diabo" a medicamento do establishment? *Ciência e cultura* 32(5):684-690, 1979.
- CASSEWELL, S.; MARKS, D.F. Cannabis and temporal desintegration in experienced and naive subjects. *Science* 179:803-905, 1972.
- CRABBE, J.C.; RIGTERH, UIJLEN, J.; STRIJBOS, C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J Pharm Exp Ther* 208:128-133, 1979.
- DARLEY, C.F.; TINKLENBERG, W.T. *Marijuana and Memory*, p.73-102, L.L. Miller, ed., Academic Press, New York, 1974.
- DELACOUR, J.; BASSANT, M.H.; ONOFRI, M.; SANTUCCI, V.; KLEINLOGEL, H. Electrophysiological models for the study of cognition enhances. *Pharmacopsychiatry* 23:90-96, 1990.
- DENEU, G.A.; KAYMAKCALAM, S. *Pharmacologist*, 13, 246 1971.
- DEVANE, W. A. ; DYSARZ II F. A. ; JOHNSON, M. R., MELVIS, L.S.; HOWLETT, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol* 34:605-613.
- DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; RIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1947, 1992.
- DI MARZO, V.; MELCK, D.; BISOGNO, T.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 21(12):521-528, 1998.
- DOBLIN, R.; KLEIMAN, M.A.R. The medical use of marijuana: the case for clinical trials. *J Addictive Disorders* 14:5-14, 1995.

- FEHR, K. O. and KALANT, H. In : Cannabis and Health Hazards: Proceedings of an ARF/WHO Scientific Meeting on Adverse Health and Behavioural consequences of Cannabis Use (Fehr, K.O. and Kalant, H., eds), pp. 1-65, Addiction Research Foundation Press, 1983.
- FERRARI, F.; OTTANI, A.; VIVOLI, R.; GIULIANI, D. Learning impairment produced in rats by the cannabinoid agonist HU 210 in a water-maze task. *Pharmacol Biochem Behav* 64(3):555-61, 1999.
- FERRARO, D.P.; GRILLY, D.M. Lack of tolerance to Δ^9 -tetrahydrocannabinol in chimpanzees. *Science* 179:490-492, 1972.
- FIBIGER, H.C. Cholinergic mechanisms in learning memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends in Neurosci* 14:220-223, 1991.
- FONSECA, F.R.; GORRITI, M.A.; FERNANDEZ-RUIZ, J.J.; PALOMO, T.; RAMOS, J.A. Down-regulation of rat brain cannabinoid binding sites after chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment. *Pharmacol Biochem Behav* 47:33-40, 1994.
- FRANKE, I.; GROTHEY, A.; KOCH, S.; WITELLER, F.J.; BINDER, M.; SANDERMANN, H. Jr. N-ethyl-17(R,S)-methyl-(6aR,10aR)-delta 8-tetrahydrocannabinol-18-oic amide. Brain pharmacokinetics in mice, triglyceride/phospholipid partitioning and generalization to the discriminative stimulus properties of delta 9-THC in rats. *Biochem Pharmacol* 34(22):3983-6, 1985.
- GALDURÓZ, J.C.F.; NOTO, A. R.; CARLINI, E.A. IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras-1997. Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicotrópicas - Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina, 1997.
- GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of the active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-1647, 1964.
- GESSA, G.L.; CASU, M.A.; CARTA, G.; MASCIA, M.S. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial pre-frontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A *Eur J Pharmacol* 355:119-124, 1998.
- GOUGH, A. L.; OLLEY, J. E. Delta-9-tetrahydro-cannabinol and the extrapyramidal system, *Psychopharmacol* 54:87-99, 1977.
- HAMPSON, R.E. Cannabinoids, hippocampal function and memory, *Life Sci* 65 (6-7):715-723, 1999.

- HERKENHAM, M.; LYNN, A. B.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; DE COSTA, B.R.; RICE, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J neurosci* 11:563-583. 1991.
- HEYSER, C.J.; HAMPSON, R.E.; DEADWYLER, S.A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: Alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 264:294-307.
- HIRST, R.A.; LAMBERT, D.G.; NOTCUTT, W.G. Pharmacology and potential therapeutic uses of cannabis. *British J Anaesthesia* 81:77-84.
- HOWLETT, A.C.; FLEMING, R.M. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26 (3):532-538, 1984.
- HUTCHESON, D.M.; TZAVARA, E.T.; SMADJA, C.; VALJENT, E.; ROQUES, B.P.; HANOUNE, J.; MALDONATO, R. Behavioural and biochemical evidence for signs of abstinence in mice chronically treated with Δ -9-tetrahydrocannabinol. *B. J. Pharm.* 125:1567-1577, 1998.
- IZQUIERDO, I. Endogenous state dependency: memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and at the time of testing. In: LYNCH, G.; McGAUGH, J.L. e WEINBERGUER, N.M. eds. *Neurobiol of learning and memory*. New York, Guilford Press, 1984. P. 333-350.
- KALANT, H.; LEBLANC, A.E. Effect of acute and chronic pretreatment with Δ^1 -tetrahydrocannabinol on motor impairment by ethanol in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 52:291-297, 1974.
- KARCZ-KUBICHA, M.; LILJEQUIST, S. Effects of post-ethanol administration of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the development of ethanol tolerance in C57BI mice. *Psychopharmacol* 120:49-56, 1995.
- KHANNA, J.M.; KALANT, H.; SHAG, G.; WEINER, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav* 38:427-432, 1991.
- KHANNA, J.M. ; KALANT, H. ; WEINER J.; SHAH, G. Rapid tolerance as predictors of chronic tolerance and cross tolerance. *Pharmacol Biochem Behav* 41:355-360, 1992.
- KHANNA, J.M.; SHAH, G.; CHAU, A. Effect of NMDA antagonists on rapid tolerance to ethanol under two different testing paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 57:693-697, 1997.

- KLAPDOR, K.; STAAV, F.J.V.D. Repeated Acquisition of a spatial navigation task in mice: Effects of spacing of trials and of unilateral middle cerebral artery occlusion. *Physiol Behav* 63(5):903-909, 1998.
- LE, A.D.; KALANT, H. Learning as a factor in ethanol tolerance. *NIDA Res Monogr* 97:193-207, 1990.
- LICHTMAN, A H.; DIMEN, K. R.; MARTIN, B.R. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacol* 119:282-290, 1995.
- LICHTMAN, A H.; MARTIN, B.R. Δ -9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism *Psychopharmacol* 126:125-131, 1996.
- McGAUGH, J.L.; HERZ, M.J. *Memory consolidation*. San Francisco, Albion, 1972.
- MACNAMARA, R. K.; SKELTON, R. W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research Review* 18: 33-49, 1993.
- MANNO, J.E.; KIPLINGER, G.F.; SCHOLS, N.; FORNEY, R.B.; HAINE, S.E. The influence of alcohol and marijuana on motor and mental performance. *Clin Pharmacol Ther* 11:808-815, 1970.
- MARTIN, B.R.; DEWEY, W.L.; HARRIS, L.S. ^3H - Δ^9 -Tetrahydrocannabinol tissue and subcellular distribution in the central nervous system and tissue distribution in peripheral organs of tolerant and nontolerant dogs, *J Pharmacol Ther* 196:128-144, 1976.
- MARTIN, B.R.; BALSTER, L.R.; RAZDAN, R.K.; HARRIS, L.S.; DEWEY, W.L. Behavioural comparisons of the stereoisomers of tetrahydrocannabinols. *Life Sci*, 29:565-574, 1981.
- MARTIN, B.R. Characterization of the antinociceptive of intravenously administered delta-9-tetrahydrocannabinol in mice, in: Harvey, DJ (ed) Marijuana'84, Proceedings of the Oxford Symposium on Cannabis. Oxford, IRL Press, pp 685-692, 1985.
- MATSUDA, L.A ; LOLAIT, S.J.; BROWSTEIN, M.J.; YOUNG, A .C.; BONNER, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564, 1990.
- MECHOULAM, R.; DEVANE, W.A ; BREUER, A .; ZAHALKA, J. A random walk through a cannabis field. *Pharmacol Biochem Behav* 40(3)461-464, 1991.
- MECHOULAM, R.; FRIDE, E.; DI MARZO, V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 359:1-18, 1998.

- MELGES, F.T.; TINKLENBERG, J.R.; HOLLISTER, L.E.; GILLESPIE, H.K. Marijuana and temporal desintegration. *Science* 168:1118-1120, 1970.
- MILLER, L.L.; BRANCONNIER, R.J.:Cannabis: Effects on memory and the cholinergic limbic system. *Psychol. Bull* 93:441-456,1983.
- MOLINA-HOLGADO, F.; GONZÁLEZ, M.I.; LERET, M.L. Effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on short-term memory in the rat. *Physiol Behav* 57:177-179, 1995.
- MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-65, 1993.
- NAKAMURA, E.M.; Da SILVA, E.A ; CONCÍLIO, G.V.; WILKINSON, D.A ; MASUR, J. Reversible effects of acute and long-term administration of Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug and Alcohol Dependence* 28:167-175, 1991.
- NOWICKY, A.V.; TEYLER, T.J.; VARDARIS, R.M. The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, *in vitro*. *Brain Res Bull* 19:663-672, 1987.
- ONAIVI, E.S.; GREEN, M.R.; MARTIN, B.R. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated Plus Maze. *J Pharmacol Therap* 253(3):1002-1009, 1990.
- OVIEDO, A.; GLOWA, J.; HERKENHAM, M. Chronic cannabinoid administration alters cannabinoid receptor binding in rat brain:a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 616:293-302, 1993.
- PASQUALE, A.; COSTA, G.; TROVATO, A. Effects of cannabis resin on learning by repetition in the rat. *Bull Narc* 30(2):55-61, 1978.
- PENTILA, M.; PARTANEN, J.V.; SOININEN, H.; RIEKKINEN, P.J. Quantitative analysis of occipital EEG in different stages of Alzheimer's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 60: 1-6, 1985.
- PERTWEE, R.G. Tolerance to the effect of delta-1-tetrahydrocannabinol on corticosterone level in mouse plasma produced by repeated administration of cannabis extract or delta-1-tetrahydrocannabinol, *Br J Pharmacol* 51:391-397, 1974.
- PERTWEE, R.G. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol and Ther* 36:189-261, 1988.
- PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A; GRIFFIN, G. Cross-tolerance between delta-9-tetrahydrocannabinol and the cannabimimetic agents, CP 55,940, WIN 55,212-2 and anandamide. *Br J Pharmacol* 110(4):1483-1490, 1993.

- PETITET, F. ; JEANTAUD, B.; REIBAUD, M.; IMPERATO, A. ; DUBROEUCQ, M.C.
Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63:PI1-PI5, 1998.
- RAZDAN, R.K., Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* 38, 75-149, 1986.
- RIEKKINEN, P.; BUSZAKI, G.; RIEKKINEN, P. Jr.; SOININEN, H.; PARTANEN, J. The cholinergic system and EEG slow waves. *Electroencephalogr clin Neurophysiol* 78:89-96, 1991.
- RINALDI-CARMONA, M.; BARTH, F.; HEAULME, M.; SHIRE, D.; CALANDRA, B.; CONGY, C.; MARTINEZ, J.; NELIAT, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; SOUBRIE, P.; BRELIERE, J.C.; LE FUR, G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350: 240-244, 1994.
- RINALDI-CARMONA, M.; PIALOT, F.; CONGY, C.; REDON, E.; BARTH, F.; BACHY, A.; BRELIERE, J.C.; SOUBRIE, P.; LE FUR, G. characterization and distribution of binding sites for [3 H]-SR 141716^A, a selective brain (CB₁) cannabinoid receptor antagonist, in rodent brain *Life Sci* 58:1239-1247, 1996.
- SEMJONOW, A.; BINDER, M. Generalization of the discriminative stimulus properties of delta-9-THC to delta 9(11)-THC in rats. *Psychopharmacol* 85(2):178-183.
- SHIRE, D.; CARILLON, C.; KAGHAD, M.; CALANDRA, B.; RINALDI-CARMONA, M.; LE FUR G.; CAPUT, D.; FERRARA, P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 270(8):3726-3731, 1995.
- SHOHAMI, E.; NOVIKOV, M.; BASS, R. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Res* 674(1):55-62, 1995.
- SIEGEL, S. Morphine analgesic tolerance: Its situation specificity supports a Pavlovian conditioning model. *Science* 193:323-325, 1976.
- SIEMENS, A. J.; DOYLE, O. L. Cross-tolerance between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and ethanol: The role of drug disposition. *Pharmacol Biochem Behav* 10:49-55, 1979.
- SIMON, C.W.; EMMONS, W.H. EEG, consciousness, and sleep. *Science* 124, 1066-1072, 1956.
- SPRAGUE, G.L.; CRAIGMILL, A. L.; Ethanol and delta-9-tetrahydrocannabinol: Mechanism for cross-tolerance in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 5:409-415, 1976.

- SQUIRE, L.R.; BUTTERS, N. *Neuropsychology of memory*, Guilford press, New York. 1984.
- SQUIRE, L.R.; KNOWLTON, B.J. In *The cognitive neurosciences*, ed. Gazzaniga, M. (MIT Press, Cambridge, MA), pp. 825-837.
- STEWART, C.A.; MORRIS, R.G.M. The water-maze. In: *behavioural neuroscience, A practical approach* (SAHGAL, A. ed) Oxford University Press, 1993 pp. 107-122.
- STIGLICK, A; KALANT, H. Learning impairment in the radial-arm maze following prolonged cannabis treatment in rats. *Psychopharmacol* 77:117-123, 1982.
- TABAKOFF, B.; CORNELL, L.; HOFFMAN, P.L. Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med* 15: 105-112, 1986.
- TAKAHASHI RN, SINGER G Self-administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by rats. *Pharmacol Biochem Behav* 11:737-740, 1979.
- TART, C.T. Marijuana Intoxication: Common Experiences. *Nature* 226:701-704, 1970.
- TERRANOVA, J.P.; STORME, J.J.; LAFON, N.; PERIO, A.; RINALDI-CARMONA, M.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Improvement of memory in rodents by the selective CBI cannabinoid receptor antagonist, SR141716. *Psychopharmacol* 26(2):165-172,1996.
- THOMPSON, G.; FLEISCHMAN, R.; ROSNKRANTZ, H.; BRAUDE, M. Oral and intravenous toxicity of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Toxicol and Appl Pharmacol* 27:648-665, 1974.
- TSOU, K.; PATRICK, S.L.; WALTER, J.M. Physical withdrawal in rats tolerant to Δ^9 -tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor antagonist. *Europ. J. Pharmacol.* 280:R13-R15, 1995.
- WALL, M.E.; SADLER, B.M.; BRINE, D.; TAYLOR, H.; PEREZ-REYES, M. Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women *Clin. Pharmacol. Ther.* 34:352, 1983.
- WEIL, A.T.; ZINBERG, N.E.; NELSEN Clinical and psychological effects of marijuana in man *Science* 162 (859), 1234-1242 (1968).
- WIKLER, A. Conditioning of successive adaptive responses to the initial effects of drugs. *Cond. reflex* 8:193-210, 1973.