

**LUCIANO DA CONCEIÇÃO BATISTA**

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO NAS  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE,  
TOLERÂNCIA E REFORÇO POSITIVO INDUZIDAS PELO  
ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

Florianópolis  
2006

**LUCIANO DA CONCEIÇÃO BATISTA**

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA ADENOSINÉRGICO NAS  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE ANSIEDADE,  
TOLERÂNCIA E REFORÇO POSITIVO INDUZIDAS PELO  
ETANOL EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi**

Florianópolis  
2006

*Aos meus pais, Márcia e Flávio, por todo o amor,  
carinho, incentivo e dedicação; às minhas irmãs,  
Flavielle e Marcelle, amo muito vocês!*

*“Os homens em geral formam suas opiniões guiando-se antes pela vista do que pelo tato; pois todos sabem ver, mas poucos sentir. Cada qual vê o que parecemos ser, mas poucos sentem o que realmente somos”.*

*Maquiavel*

## PRECISA-SE

De pessoas que tenham os pés na terra e a cabeça nas estrelas.

Capazes de sonhar, sem medo de seus sonhos.

Tão idealistas que transformem seus sonhos em metas.

Pessoas tão práticas que sejam capazes de tornar suas metas realistas.

Pessoas determinadas que nunca abram mão de construir seus destinos e arquitetar suas vidas.

Que não temam mudanças e saibam tirar proveito delas.

Que tornem seu trabalho objeto de prazer e uma porção substancial de realização pessoal.

Que percebam na visão e na missão de suas empresas, um forte impulso para a sua própria motivação.

Pessoas com dignidade e que se conduzam com coerência em seus discursos, seus atos, suas crenças e seus valores.

Precisa-se de pessoas que questionem, não pela simples contestação, mas pela necessidade íntima de só aplicar as melhores idéias.

Pessoas que mostrem sua face serena de parceiros leais, sem se mostrar superiores nem inferiores, mas... iguais.

Precisa-se de pessoas ávidas por aprender e que se orgulhem de absorver o novo.

Pessoas com coragem para abrir caminhos, enfrentar desafios, criar soluções, correr riscos calculados sem medo de errar.

Precisa-se de pessoas que construam suas equipes e se integrem nelas.

Que não tomem para si o poder, mas saibam compartilhá-lo.

Pessoas que não se empolguem com o próprio brilho, mas com o brilho do resultado alcançado em conjunto.

Precisa-se de pessoas que enxerguem as árvores, mas também prestem atenção na magia da floresta – que tenham percepção do todo e da parte.

Seres humanos justos, que inspirem confiança e demonstrem confiança nos parceiros, estimulando-os, energizando-os, sem receio que lhe façam sombra e sim orgulham-se deles.

Precisa-se de pessoas que criem em torno de si um ambiente de entusiasmo, de liberdade, de responsabilidade, de determinação, de respeito e de amizade.

Precisa-se de seres racionais. Tão racionais que compreendam que sua realização pessoal está atrelada à vazão de emoções.

É na emoção que encontramos a razão de viver.

Precisa-se de gente que saiba administrar as COISAS e liderar PESSOAS.

Precisa-se urgentemente se repensar um novo ser.

TUDO SE INICIA NA PRÓPRIA PESSOA

Autor desconhecido

## AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que me acompanharam, e acompanham, nestes anos de formação e que permitiram a realização de uma série de projetos, de sonhos e fantasias, e de amizades, que felizmente vão muito além desta dissertação.

Aqueles que construíram e compartilham do sonho de fazer pesquisa e ciência, e de alguma forma mudar nossa realidade, fazendo disso uma paixão e dedicação.

A esta energia poderosa, muitas vezes chamada de Deus, que sempre me guia e ilumina, dando força e motivação para prosseguir o meu caminho.

Ao Professor Reinaldo, um grande mestre, pela honra de ter usufruído de sua sabedoria, amizade e orientação, que tem contribuído enormemente para minha formação científica, pessoal e intelectual. E pelo privilégio de conviver em um “ambiente enriquecido” e “enriquecedor” desde minha iniciação científica.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia desta instituição, pelos ensinamentos, pela convivência, e pelo cultivo da arte do saber.

A toda a minha família, em especial aos meus pais Márcia e Flávio; minhas irmãs Flavielle e Marcelle; a minha tia Júlia e tio ‘Zezo’ (*in memoriam*) e aos meus primos André, Juliano e Cristiane, por todo o amor, apoio incondicional e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Psicofarmacologia I, Rui, Leandro, George, Fabrício (Juca), Pamplona, Pablo, Meigy, Vanessa, Rafael, pela agradável e harmoniosa convivência, pelos sonhos e projetos compartilhados... alguns em execução!

Aos amigos e colegas da “Farmaco”, pelas conversas e risadas nos corredores, pelas discussões “filosóficas” e pela agradável companhia.

Aos amigos Rui e Leandro, dois grandes irmãos que vem me acompanhando tanto nos momentos de alegria quanto de frustração desde o tempo da graduação, pela estreita colaboração para a realização deste estudo. Obrigado pelos seus conselhos, solidariedade e, mais do que tudo, AMIZADE.

À Vanessa, por todo o seu carinho, apoio, dedicação e convivência, que proporcionaram formidáveis momentos de alegria e felicidade ao longo desta jornada. E a toda a sua família, em especial ao Leonardo, Elaine, Zeneide, Rodrigo, Gisele e à pequena Isabela.

Aos amigos de hoje e sempre: Karina, Alex, Carolzinha, Michel, Atahualpa, Rodrigo, Enrico, Jana, Santamaria, Gó, Ricardo, Cado, Giorgio, Ênio, Jonh, Guigo, Gled, Sandra, Marco e Patrícia, pelos inúmeros momentos agradáveis e de descontração, e por vocês fazerem parte da minha vida de uma maneira muito especial.

Aos novos amigos: Vivi, Fernando e Elisa, por terem me mostrado um novo Caminho, cheio de harmonia, paz, amor, sabedoria e conexão com a natureza.

À Marina, linda e encantadora, pelo carinho, sensibilidade, amizade, e por ser uma mulher maravilhosa que encontrei no final desta etapa.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, que sempre me ajudaram no que fosse preciso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo apoio financeiro.

*AHÔ MITAKUYE OYASIN*

**SUMÁRIO**

|  |     |
|--|-----|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>   | iv  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | vi  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>  | ix  |
| <b>RESUMO</b>  | x   |
| <b>ABSTRACT</b>  | xii |
| <br>   |     |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 1   |
| 1.1. Efeitos comportamentais do etanol                               | 2   |
| 1.2. Sistemas de Neurotransmissores envolvidos nos efeitos do etanol | 10  |
| 1.3. Sistema adenosinérgico x etanol                                 | 12  |
| <br>   |     |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | 21  |
| 2.1. Objetivos gerais  | 21  |
| 2.2. Objetivos específicos   | 21  |
| <br>   |     |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>   | 22  |
| 3.1. Animais   | 22  |
| 3.2. Drogas e reagentes  | 22  |
| 3.3. Modelos comportamentais   | 23  |
| 3.3.1. Labirinto em cruz elevado                                     | 23  |
| 3.3.2. Campo aberto  | 24  |
| 3.3.3. Rota-rod  | 25  |
| 3.3.4. Preferência condicionada de lugar                             | 27  |



---

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4. Procedimentos experimentais  | 29        |
| 3.4.1. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no efeito tipo-ansiolítico do etanol no labirinto em cruz elevado  | 29        |
| 3.4.2. Comportamento tipo-ansio gênico induzido pela abstinência aguda (ressaca) do etanol em camundongos   | 29        |
| 3.4.3. Dosagem sanguínea de etanol durante a ressaca  | 30        |
| 3.4.4. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no comportamento tipo-ansio gênico induzido pela ressaca do etanol   | 30        |
| 3.4.5. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A na tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol  | 31        |
| 3.4.6. Efeito do antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina cafeína nas fases de aquisição e expressão da preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol em camundongos | 31        |
| 3.5. Análise Estatística  | 32        |
| <b>4. RESULTADOS</b>  | <b>33</b> |
| 4.1. Efeito do tratamento agudo com etanol em comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado  | 33        |
| 4.2. Efeito de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina A1 e A2A no labirinto em cruz elevado e campo aberto  | 35        |
| 4.3. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no efeito tipo-ansiolítico do etanol no labirinto em cruz elevado  | 40        |
| 4.4. Efeito da administração combinada de etanol e do agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA em comportamentos   |           |

---

|  |     |
|--|-----|
| relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado  | 42  |
| 4.5. Comportamento tipo-ansio gênico induzido pela abstinência aguda<br>(ressaca) do etanol em camundongos                             | 44  |
| 4.6. Dosagem sanguínea de etanol durante a ressaca   | 46  |
| 4.7. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no<br>comportamento tipo-ansio gênico induzido pela ressaca do etanol           | 46  |
| 4.8. Desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação<br>motora ao etanol ao longo do tempo                                 | 54  |
| 4.9. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A na<br>tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol      | 55  |
| 4.10. Aquisição da preferência condicionada de lugar induzida<br>pelo etanol   | 59  |
| 4.11. Efeito da cafeína nas fases de aquisição e expressão da preferência<br>condicionada de lugar induzida pelo etanol em camundongos | 60  |
| <br>   |     |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>  | 63  |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>   | 79  |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | 80  |
| <b>8. ANEXOS</b>   | 103 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ADA – adenosina deaminase

ADP – adenosina di-fosfato

AMP – adenosina mono-fosfato

5'-AMP – monofosfato 5'-adenosina

AMPc – monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina tri-fosfato

Ca<sup>2+</sup> - íons cálcio

CCPA - 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina

Cl<sup>-</sup> - íons cloreto

DPCPX - 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina

DPMA - N6-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)etil]adenosina

DSM – Manual Diagnóstico Estatístico

E.P.M. – erro padrão da média

g/kg – gramas por quilogramas

GABA – ácido gama-aminobutírico

GMPC - guanidina monofosfato cíclico

h - horas

i.p. - intraperitoneal

K<sup>+</sup> - íons potássio

KO - nocaute

LTP – potenciação de longa duração

mg/dl – miligramas por decilitro

mg/kg – miligramas por quilogramas

min - minutos

mM - micromolar

Na<sup>2+</sup> - íons sódio

nM - nanomolar

NMDA – n-metil-D-aspartato

SAH - S-adenosil homocisteína

s.c. - subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

ZM241385 - 4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo-{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol

**LISTA DE FIGURAS**

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama descrevendo o ciclo da dependência  | 4  |
| Figura 2. Esquema simplificado dos mecanismos intracelulares e extracelulares responsáveis pela formação e regulação metabólica da adenosina   | 14 |
| Figura 3. Labirinto em cruz elevado utilizado para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade  | 24 |
| Figura 4. Arena do teste do campo aberto utilizado para avaliação da atividade locomotora  | 25 |
| Figura 5. Rota-rod utilizado para avaliação da coordenação motora.   | 26 |
| Figura 6. Caixa de condicionamento de lugar utilizado para a avaliação de propriedades reforçadoras de drogas  | 27 |
| Figura 7. Efeito do tratamento agudo com etanol em comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado  | 34 |
| Figura 8. Efeitos do tratamento com antagonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado   | 39 |
| Figura 9. Efeito do tratamento com antagonistas adenosinérgicos no efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado                        | 41 |
| Figura 10. Efeito da administração combinada de etanol e do agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado | 43 |
| Figura 11. Comportamento tipo-ansio gênico induzido pela abstinência aguda (ressaca) do etanol em camundongos  | 45 |
| Figura 12. Concentração sanguínea de etanol (mg/dL) verificada em  |    |

---

|  |    |
|--|----|
| intervalos de 0,5; 2, 4, 6 ou 12 h após a administração aguda de etanol<br>(4,0 g/kg, i.p.) em camundongos   | 46 |
| Figura 13. Efeito do tratamento com adenosina no comportamento<br>tipo-ansiolítico induzida pela ressaca do etanol em camundongos<br>avaliados no labirinto em cruz elevado  | 48 |
| Figura 14. Efeito do tratamento com o agonista seletivo dos receptores de<br>adenosina A1 CCPA no comportamento tipo-ansiolítico induzida pela ressaca<br>do etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado  | 50 |
| Figura 15. Efeito do tratamento com o agonista seletivo dos receptores<br>de adenosina A2A DPMA no comportamento tipo-ansiolítico induzida<br>pela ressaca do etanol em camundongos avaliados no labirinto<br>em cruz elevado  | 51 |
| Figura 16. Efeito da administração do antagonista dos receptores A1<br>DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.), 15 min antes da injeção do CCPA (agonista do<br>receptor A1, 0,05 mg/kg, i.p.) ou veículo (i.p.) em camundongos<br>previamente (18 h antes) tratados com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e testados<br>30 min depois no labirinto em cruz elevado | 53 |
| Figura 17. Desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação<br>motora ao etanol ao longo do tempo   | 55 |
| Figura 18. Efeito do antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina<br>caféina no desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação<br>motora induzida pelo etanol em camundongos avaliados no rota-rod  | 57 |
| Figura 19. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no<br>desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora<br>induzida pelo etanol em camundongos avaliados no rota-rod   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20. Aquisição da preferência condicionada de lugar quanto ao tempo de permanência no compartimento pareado com etanol (0,5; 1,0 ou 2,0 g/kg, i.p.) ou salina em camundongos | 59 |
| Figura 21. Efeito da cafeína (10,0; 20,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) na aquisição da preferência condicionada de lugar ao etanol (2,0 g/kg, i.p.) em camundongos                          | 61 |
| Figura 22. Efeito da cafeína (10,0 ou 20,0 mg/kg, i.p.) na expressão da preferência condicionada de lugar ao etanol (2,0 g/kg, i.p.) em camundongos                                | 62 |
| Figura 23. Diagrama ilustrando a participação dos receptores A1 de adenosina no ciclo da dependência ao etanol   | 78 |

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Características dos subtipos de receptores de adenosina presentes no SNC                                   | 17 |
| Tabela 2. Efeito da administração de agonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado | 36 |
| Tabela 3. Efeitos da administração de agonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no campo aberto             | 37 |



**RESUMO**

Um número crescente de evidências tem apontado para o neuromodulador adenosina como um importante mediador de várias respostas comportamentais, moleculares e celulares promovidas pelo etanol, tanto em humanos quanto em roedores. Contudo, relativamente pouco se sabe sobre o envolvimento deste sistema em comportamentos relacionados à ansiedade após tratamento agudo ou após a abstinência do etanol, bem como nas respostas neuroadaptativas verificadas após a exposição repetida, como o desenvolvimento de tolerância e reforço positivo do etanol, supostamente implicados na iniciação, manutenção e recaída ao consumo de etanol em modelos animais.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel dos receptores de adenosina no efeito tipo-ansiolítico do etanol, bem como avaliar o potencial de agonistas dos receptores de adenosina A1 e A2A em reduzir o comportamento tipo-ansiossênico observado durante a abstinência aguda (ressaca) em camundongos testados no labirinto em cruz elevado. Além disso, o envolvimento dos receptores de adenosina no desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol, assim como na preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol em camundongos, também foram investigados neste estudo.

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez, que os receptores de adenosina, principalmente os receptores A1, modulam as repostas tipo-ansiolíticas induzidas pela administração aguda de etanol (1,2 g/kg, i.p.), assim como o efeito tipo-ansiossênico (ressaca) verificado 18 h após o tratamento sistêmico com uma dose elevada de etanol (4,0 g/kg) em camundongos testados no labirinto em cruz elevado. Os presentes resultados evidenciam ainda que o bloqueio dos receptores A1 para adenosina, mas não dos receptores A2A, modula importantes neuroadaptações funcionais observadas durante a exposição repetida ao etanol, como o desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora em camundongos testados no

rota-rod. Além disso, demonstram que o bloqueio não-seletivo dos receptores de adenosina, mediado pela cafeína, não altera o reforço positivo induzido pelo etanol em camundongos avaliados no teste da preferência condicionada de lugar.

Em conjunto, estas evidências sugerem que a manipulação farmacológica do sistema adenosinérgico possui potencial para atenuar os efeitos do uso do etanol, podendo representar uma importante ferramenta no tratamento do alcoolismo. Além disso, a complexidade e diversidade dos componentes envolvidos no desenvolvimento do alcoolismo (sensibilidade inicial, tolerância, sensibilização, abstinência, desejo e recaída), requerem estudos mais detalhados e amplos para uma melhor compreensão e caracterização das bases neurobiológicas envolvidas nesta doença.

**ABSTRACT**

Recent evidence indicates a direct role for the neuromodulator adenosine in mediating many of the cellular and behavioral responses to ethanol in both humans and rodents. The anxiolytic property of ethanol and the elevated signs of anxiety observed during withdrawal from chronic as well as acute ethanol exposure represent important motivational factors for its consumption and the development of alcohol dependence. Moreover, the tolerance mechanisms and reinforcement, can determine a person's short-term or acute response to ethanol, as well as the establishment of the long-term or chronic craving for alcohol that characterizes dependence.

The aim of the present study was to evaluate the role of adenosine receptors in the anxiolytic-like effect of ethanol, as well as the potential of adenosine A1 and A2A receptor agonists in reducing the anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (ressaca) in mice tested in the elevated plus-maze. Furthermore, the influence of adenosine receptors in the development of rapid tolerance to ethanol-induced motor incoordination, and the ability of the caffeine to modify ethanol-induced conditioned place preference also had been examined in mice.

The results indicated that acute previous administration of "non-anxiogenic" doses of caffeine (non-selective antagonist, 10.0 mg/kg, i.p.) and DPCPX (adenosine A1 receptor antagonist, 3.0 mg/kg, i.p.), but not ZM241385 (adenosine A2A receptor antagonist, 1.0 mg/kg, i.p.), significantly reduced the anxiolytic-like effect of ethanol (1.2 g/kg, i.p.), as well as blocked the rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment in mice. Moreover, an anxiolytic-like response was observed by the co-administration of "non-anxiolytic" doses of the selective adenosine A1 receptor agonist CCPA (0.125 mg/kg) and ethanol (0.6 g/kg). On the other hand, the acute administration of "non-anxiolytic" doses of adenosine and CCPA, but not the adenosine A2A receptor agonist DPMA, at the onset of peak withdrawal (18 h), reduced this anxiogenic-like response. In addition, the effect of CCPA on anxiety-like behavior of ethanol resaca was reversed

by pretreatment with the selective adenosine A1 receptor antagonist DPCPX. On the other hand, caffeine did not inhibit the acquisition and expression of ethanol-induced conditioned place preference.

These results reinforce the involvement of adenosine in anxiety and suggest that the activation of adenosine A1 receptors, but not adenosine A2A receptors, mediate the anxiolytic-like effect and the rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment in mice. Moreover, they indicate the potential of adenosine A1 receptor agonists to reduce the anxiogenic effects during ethanol withdrawal. Taken together, these data suggest that pharmacological manipulation of adenosine signalling represents a potentially useful tool for the prevention and treatment of alcoholism.



## **1. INTRODUÇÃO**

As bebidas alcoólicas têm sido utilizadas desde o início da história humana, sendo os primeiros registros datados de 6000 a.C., no antigo Egito e Babilônia (Vaillante, 1999). Estudos antropológicos mostram que inúmeros relatos da mitologia grega referem-se ao álcool etílico ou etanol como uma substância divina. Na Idade Média, ao ser introduzido o processo de destilação pelos árabes, os alquimistas passaram a acreditar que o etanol era o tão procurado elixir da vida, sendo utilizado como remédio para praticamente todas as doenças, conforme indicado pelo termo gálico *whiskey* (*usquebaugh*, que significa “água da vida”) (O’Brien, 1996).

Atualmente, reconhece-se que o valor terapêutico do etanol é extremamente limitado, e que o consumo crônico deste em quantidades excessivas representa um grave problema clínico e social. O consumo de etanol, tabaco e outras drogas de abuso estão presentes em quase todos os países do mundo, sendo que mais da metade da população das Américas e da Europa já experimentou etanol alguma vez na vida (OMS, 2004).

No Brasil, estima-se que uma em cada dez pessoas tenha problemas decorrentes do consumo indevido de etanol, sendo este responsável por aproximadamente 80-85% das internações em hospitais e clínicas psiquiátricas (CEBRID, 2002). Além disso, o consumo de etanol está relacionado com 50% dos casos de morte em acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios (Leite, 2001). Por estas e outras razões, o consumo abusivo de etanol é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença, devendo, por este motivo, ser desvinculado de qualquer conotação moral ou de valores referentes ao indivíduo.

### 1.1. Efeitos comportamentais do etanol

O etanol promove uma variedade de efeitos fisiológicos e comportamentais que aparecem em duas etapas distintas (uma estimulante e outra depressora) (Chandler *et al.*, 1998). Nos primeiros momentos após a ingestão de etanol, podem aparecer os efeitos estimulantes, como euforia, desembaraço, que frequentemente são acompanhados da redução de estados de ansiedade e estresse. Esta estimulação aparente resulta, em grande parte, da redução dos mecanismos do controle inibitório do encéfalo (O'Brien, 1996).

À medida que o nível plasmático de etanol se eleva, começam a surgir os efeitos depressores, como o comprometimento da coordenação motora e fala, confusão mental e sedação, além de prejudicar a concentração e a memória. Em concentrações extremamente elevadas (alcoolemia de 300 a 500 mg/dL), o efeito depressor fica exacerbado, ocorrendo náusea e vômito, seguidos de anestesia profunda, depressão respiratória, perda dos reflexos e hipotermia, podendo até provocar coma e morte (Fadda e Rossetti, 1998; Nutt, 1999). Esta ampla variedade de efeitos parece ser devido à complexa interação do etanol com os diversos sistemas excitatórios e inibitórios encefálicos (Nutt, 1999).

Cronicamente, o etanol leva a um processo conhecido como demência alcoólica, resultando em prejuízo neurológico, com comprometimento tanto das funções intelectuais (percepção, memória, emoção), quanto motoras (por degeneração cerebelar). Entre várias outras alterações o sistema hepático é extremamente afetado pelo etanol, podendo causar cirrose e hepatite com o seu consumo crônico (Pritchard e Nagy, 2005). No sistema hematológico pode ocorrer elevação do volume corpuscular médio das células vermelhas (eritrócitos ou hemáceas) devido à deficiência de ácido fólico, resultando, eventualmente, em anemia megaloblástica, além de plaquetopenia e leucopenia, comprometendo o sistema imunológico (Ballard, 1997; Bode e Bode, 2005). Em outros sistemas como o gastrointestinal, o consumo de etanol pode originar câncer, gastrite e úlceras (Jian *et al.*, 1986; Bode e Bode, 1997; 2005). No sistema endócrino/reprodutivo, diminuição do nível do

hormônio antidiurético, hipoglicemia, feminilização em homens, infertilidade e diminuição da libido, além de carências nutricionais, lesões musculares e dermatológicas (Emanuele e Emanuele, 1997).

O alcoolismo, ou mais precisamente, a síndrome da dependência do etanol, pode ser definido como um complexo transtorno comportamental caracterizado pelo consumo excessivo, uso compulsivo (perda do controle sobre o consumo) e pela preocupação exagerada em obter o etanol (Koob, 2003). A euforia que segue após a primeira dose de etanol, particularmente familiar para muitos, como perda do julgamento e controle, pode levar, após o uso crônico, a intensificação da quantidade consumida e o persistente desejo pela droga, envolve complexas interações entre fatores genéticos, psicosociais, ambientais e neurobiológicos (Weiss e Porrino, 2002).

Desta maneira, a dependência do etanol envolve um grande número de interações entre diversos mecanismos neurais, incluindo a sensibilidade aguda ao etanol, desenvolvimento de tolerância, sensibilização e dependência, bem como de um intenso desejo em consumir a droga (muitas vezes chamado de “fissura”) (Lovinger e Crabbe, 2005).

Por muitos anos foi proposto que o etanol exercia seus efeitos neurobiológicos principalmente por aumentar a fluidez das membranas, alterando a função de macro-moléculas presentes nas membranas celulares. Entretanto, nos últimos 20 anos muitas evidências têm apontado para a ação do etanol em sítios hidrofóbicos específicos das proteínas, modulando determinada função através da alteração de sua estrutura tridimensional (Kiefer e Mann, 2005).

Neste sentido, o etanol pode produzir tanto ações diretas em moléculas que levam à intoxicação e influenciam respostas para o consumo crônico, como também atuar indiretamente em outros alvos moleculares, modulando desta maneira a expressão ou função de moléculas que são alvos diretos do etanol ou alterando a função de circuitos neurais envolvidos em processos mais elaborados responsáveis pelo desenvolvimento da dependência e de mudanças neuroadaptativas residuais, que conferem vulnerabilidade à recaída (Koob, 2003; Lovinger e Crabbe, 2005). Estas



alterações contribuem para os estágios agudos e crônicos do uso do etanol, influenciando a vulnerabilidade ao abuso e, por conseguinte, a expressão do alcoolismo (Lovinger e Crabbe, 2005).

Segundo a teoria proposta por Koob e Le Moal (1997), a dependência a uma determinada substância se desenvolve através de um ciclo em espiral que aumenta em amplitude após a experiência repetida, resultando no estado patológico conhecido como dependência. Neste ciclo três componentes são de fundamental importância: a Preocupação-Expectativa, um importante fator motivacional para o início do uso/consumo de determinada substância; Intoxicação (uso/abuso), um componente amplamente associado ao reforço positivo; e Estado afetivo negativo (abstinência), um componente associado com o reforço negativo (Koob e Lê Moal, 1997).



Figura 1. Diagrama descrevendo o ciclo da dependência a partir de uma perspectiva psiquiátrica, com os diferentes critérios para o diagnóstico da dependência às substâncias psicoativas segundo o DSM-IV, Adaptado de Koob e Le Moal (1997).

Uma das razões do consumo de álcool pelos humanos é devido a sua ação ansiolítica. A ansiedade tem sido geralmente relacionada com o desenvolvimento da dependência, bem como recaída, ao etanol e outras drogas de abuso. De acordo com a hipótese de redução de tensão, descrita inicialmente por Conger (1956), a propriedade ansiolítica do etanol seria um importante fator motivacional para o seu consumo, já que muitos indivíduos dependentes têm relatado que utilizam bebidas alcoólicas para reduzir sua ansiedade (Conger, 1956; Pohorecky, 1981; Newlin e Thomson, 1990).

Conceitualmente, a ansiedade pode ser caracterizada como um estado emocional experimentado subjetivamente como desagradável ou ameaçador, sendo comumente acompanhada de alterações fisiológicas e comportamentais, como mudanças no humor (apreensão ou medo) e na cognição (dificuldade de raciocínio, desatenção), entre outros (Nutt, 1990; Graeff et al., 2003).

Embora a ansiedade tenha sido relacionada a uma resposta subjetiva e inerente à espécie humana, uma vez que animais de laboratório não podem verbalmente relatar seus estados subjetivos, muitos modelos experimentais têm sido propostos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, bem como na caracterização do mecanismo de ação de drogas psicoterapêuticas utilizadas na clínica, além da descoberta de novas estruturas e alvos moleculares envolvidos na patofisiologia dos transtornos psiquiátricos (Ramos e Mormède, 1998).

Uma grande variedade de modelos comportamentais tem sido desenvolvida para investigar estados emocionais de ansiedade em roedores (Flint, 2003), sendo que alguns destes buscam avaliar comportamentos de defesa característicos da espécie, ou seja, baseados na etologia. O labirinto em cruz elevado é o mais conhecido de todos os modelos animais para o estudo da ansiedade experimental (File, 1992; Rodgers, 1997; Ramos e Mormède, 1998; Kliethermes et al., 2005). Este modelo foi primeiramente validado para ratos (Pellow et al., 1985) e, posteriormente, para camundongos (Lister, 1987), sendo baseado na aversão natural dos roedores por espaços abertos (Treit et al., 1993; Fernandes e File, 1996), além de ser farmacologicamente sensível para as ações

de agentes ansiolíticos e ansiogênicos que, respectivamente, aumentam e diminuem a exploração nos braços abertos do labirinto (Dawson et al., 1995; Bertoglio e Carobrez, 2002; Amico et al., 2004; Carobrez e Bertoglio, 2005).

O efeito ansiolítico do etanol tem sido extensivamente descrito em diferentes modelos animais de ansiedade, como no labirinto em cruz elevado (Blatt e Takahashi, 1999; Ferreira et al., 2000; LaBuda e Fuchs 2002; Da Silva et al., 2005), na caixa claro-escuro (Bilkei-Gorzo et al., 1998) e no teste de interação social (File et al., 1976; Varlinskaya e Spear, 2002), entre outros.

Além disso, sinais elevados de ansiedade são observados tanto em humanos quanto em roedores quando o etanol é abruptamente retirado após a sua exposição crônica (para revisão ver Kliethermes, 2005). A síndrome de abstinência é um dos critérios de diagnóstico para a caracterização da dependência as drogas, e tem sido frequentemente relacionada com prejuízos da função fisiológica e aumento do estado afetivo negativo, sintomas fortemente associados com a recaída (Cloninger, 1987). O perfil sintomático da abstinência ao etanol tem sido bem estabelecido em humanos e outros animais, e incluem náusea, tremores, hipertermia, taquicardia, irritabilidade, ansiedade, depressão e insônia, sendo mais severos nos períodos iniciais da retirada (Finn e Crabbe, 1997; Kliethermes, 2005).

Uma forma de abstinência ao etanol, conhecida como abstinência aguda ou ressaca, pode ocorrer após uma única ingestão de grandes quantidades de etanol. Alguns sintomas da ressaca em humanos incluem cefaléia, diarreia, anorexia, fadiga e tremores (para revisões ver Smith e Barnes, 1983; Wiese et al, 2000), além de alterações psicológicas como aumento na ansiedade, sensação de culpa e depressão (Smith e Barnes, 1983; Bogin et al, 1986).

Modelos comportamentais de retirada ao etanol têm consistentemente demonstrado um aumento nos níveis de ansiedade durante o período de abstinência após exposição crônica ao etanol em roedores (File et al, 1991, 1993; Lal et al, 1991; Knapp et al, 1993; Gatch et al, 1999; Gatch e Lal, 2001). No entanto, poucos estudos têm examinado a presença destes sintomas após a

administração aguda de etanol. Gauvin e colaboradores (1992, 1993), utilizando o pentilenotetrazol, uma substância com conhecidas propriedades ansiogênicas, em tarefas de discriminação de drogas, tem demonstrado que ratos injetados intraperitonealmente com altas doses de etanol (3,0 e 4,0 g/kg), apresentam um maior número de respostas de pressão na barra induzidas pelo pentilenotetrazol, quando testados 9 a 18 h após o desafio agudo com etanol, sugerindo que esta resposta reflete estados de ansiedade relacionados à ressaca.

Recentemente, algumas evidências têm mostrado que, 18 h após a administração aguda de etanol (4,0 g/kg, i.p.), ratos adultos apresentam uma exploração reduzida nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Doremus et al., 2003), e uma significativa supressão social no teste de interação social (Varlinskaya e Spear, 2004), respostas consistentes com um perfil ansiogênico (File et al, 1976; Pellow et al, 1985).

Como mencionado anteriormente, a exposição crônica ao etanol causa neuroadaptações que contribuem para o uso e abuso continuado de etanol (Weiss et al., 2001; Heinz et al., 2003), envolvendo diversos mecanismos moleculares que são influenciados por fatores genéticos e ambientais, ou pela interação entre estes (Lovinger e Crabbe, 2005).

O fenômeno de tolerância, caracterizado como uma redução na intensidade do efeito da droga ao longo do tempo, ou em outras palavras, diminuição da sensibilidade à droga após intoxicação (Chandler et al., 1998; Kalant 1998), é uma forma bastante comum de neuroadaptação produzida pela exposição repetida ao etanol, e tem sido relatada como um importante componente que pode levar ao alcoolismo, sendo listada como um dos critérios de diagnóstico pelo Manual Diagnóstico Estatístico (American Psychiatric Association – APA, DSM-IV RT, 2000). Além disso, a tolerância ao etanol apresenta muitas implicações clínicas e farmacológicas importantes, sendo utilizada como modelo experimental para outros tipos de processos neurodegenerativos (Kalant, 1998). Estes estudos têm se revelado muito importantes para a avaliação do consumo (Waller et al.,

1983; Ploj et al., 2002) e da dependência do etanol (American Psychiatric Association – APA, DSM-IV RT, 2000).

Muitas evidências têm mostrado que os mecanismos de tolerância podem contribuir para a manutenção ou agravamento da dependência do etanol, permitindo ou ocasionando elevados níveis de consumo, que contribuem para o risco de complicações fisiológicas advindas do alcoolismo (Schuckit, 1986; Kalant, 1998). Além disso, um número crescente de evidências mostra que os mecanismos de tolerância compartilham muitos aspectos com processos de aprendizado e memória (Kalant et al., 1971; Kalant, 1996).

O desenvolvimento da tolerância está relacionado com eventos complexos que podem envolver diferentes mecanismos como: mudanças na absorção, distribuição, metabolismo e excreção (tolerância farmacocinética ou disposicional) (Kalant et al., 1971; Le et al., 1989); mudanças nos níveis celulares ou em receptores (tolerância farmacodinâmica ou celular) (Kalant et al., 1971; Tabakoff et al., 1995); bem como, mudanças no sistema neural afetado pela droga, mas que não está diretamente envolvido no efeito por ela mediado (tolerância comportamental) (Stewart e Badiani, 1993).

A tolerância ao etanol pode ocorrer de maneira tempo-dependente (Khanna et al., 2002), sendo comumente designada como tolerância aguda, desenvolvida com o curso de uma simples exposição ao etanol (Kalant et al., 1971; Khanna et al., 2002); tolerância crônica, geralmente detectada após dias, semanas ou meses de exposição repetida de etanol (Kalant et al., 1971; Littleton, 1980; Kalant e Khanna, 1990; Tabakoff, 1995; Boulouard et al., 2002); e tolerância rápida, usualmente detectada após duas exposições ao etanol com um intervalo de 8-24 horas (Crabbe et al., 1979; Khanna et al., 1991; Da Silva et al., 2001; Barbosa e Morato, 2002). A magnitude da resposta observada na tolerância rápida é frequentemente semelhante à verificada após o tratamento crônico com etanol, sendo, portanto, considerada como um indicador de tolerância crônica (Khanna et al., 1996).

Muitos ensaios comportamentais de intoxicação e tolerância ao etanol têm sido relatados em diferentes espécies, incluindo camundongos e envolvem, principalmente, aspectos da coordenação motora ou alteração da temperatura corporal (Crabbe et al., 1979; Khanna et al., 2002). Estes métodos também são utilizados para o estudo de drogas com ações hipnóticas e sedativas (Lovinger e Crabbe, 2005).

Por outro lado, a exemplo de outros distúrbios da dependência, a recaída ao uso de álcool após longos períodos de abstinência é um aspecto comum do alcoolismo (Kuzmin et al., 2003). Uma resposta fisiológica condicionada e a sensação de intenso desejo (fissura) podem ocorrer quando usuários abstinentes encontram sinais preditivos de consumo e disponibilidade pela droga (Childress et al., 1988). Esta associação “aprendida”, entre os sinais ambientais e os efeitos de reforço (positivo e negativo) gerados por substâncias psicoativas, é um importante componente da dependência em humanos (Vanderschuren e Everitt, 2004).

Diversos modelos animais têm contribuído para a identificação de fatores que estão envolvidos nos aspectos motivacionais e reforçadores que levam à retomada e procura pelo etanol. Este comportamento pode ser iniciado ou mantido tanto por estímulos primários (efeito farmacológico da droga per se), como também por estímulos secundários (sinais ambientais/contexto associados ao consumo da droga) (Chester e Cunningham, 2002; Vanderschuren e Everitt, 2004).

Um modelo experimental comumente utilizado para examinar tanto os mecanismos de desejo/fissura eliciado por sinais ambientais, quanto às propriedades reforçadoras/gratificantes das drogas de abuso em animais é o teste de preferência condicionada de lugar (para revisão ver Tzschenke, 1998). Neste paradigma, um estímulo contextual particular ou um determinado compartimento (estímulo condicionado) é pareado com o efeito produzido pela droga (estímulo incondicionado). O impacto motivacional desta associação (droga/compartimento) é que determina

a preferência ou a aversão dos animais pelo compartimento pareado previamente com a droga (Chester e Cunningham, 2002).

## **1.2. Sistemas de Neurotransmissores envolvidos nos efeitos do etanol**

Estudos eletrofisiológicos, bioquímicos e comportamentais sugerem que as respostas neuronais do etanol envolvem diversas vias de transdução de sinal ativadas por diferentes neurotransmissores, hormônios, enzimas e canais iônicos, modulando alterações de curto (agudo) e longo (crônico) prazo na expressão de genes e nas funções neurais (Ron e Jurd, 2005). Neste sentido, um grande número de evidências sugere que os sistemas GABAérgico e glutamatérgico desempenham um papel fundamental nos efeitos do etanol (Grobin et al., 1998; Krystal et al., 2003).

A exposição aguda ao etanol potencializa a transmissão inibitória mediada pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor que atua sobre receptores específicos para este aminoácido, e modula, por exemplo, a abertura de canais permeáveis ao íon cloreto (Cl<sup>-</sup>) em várias regiões encefálicas (Tabakoff, 1995; Grobin et al., 1998). Muitos dos efeitos comportamentais promovidos pelo etanol (efeito ansiolítico, anestésico, sedativo, prejuízo da atividade cognitiva e de processos motores) estão relacionados à sua capacidade de interagir com o receptor ionotrópico GABAA (Frey et al., 1981; Givens e McMahon, 1995).

Desta maneira, os efeitos mediados pelo etanol são potencializados por agonistas, e atenuados por antagonistas ou agonistas inversos dos receptores gabaérgicos. O consumo crônico de etanol modifica a estrutura destes receptores, promovendo alterações tanto na composição das subunidades, quanto na sensibilidade para ligantes, que culminam em “down-regulation” compensatória deste sistema (Grobin et al., 1998; Hancher et al., 2004).

A neurotransmissão sináptica glutamatérgica, e especialmente a mediada por receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), um receptor ionotrópico que controla a

abertura de canais permeáveis aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sódio ( $\text{Na}^{2+}$ ) e potássio ( $\text{K}^{+}$ ) (Tabakoff, 1995), têm recebido, assim como o sistema GABAérgico, considerável atenção em relação ao seu papel na regulação dos efeitos mediados pelo etanol (Siggins et al., 2003). A administração aguda de etanol consistentemente resulta na atenuação dose-dependente da neurotransmissão excitatória mediada pelo aminoácido glutamato (Liljequist, 1991; Tsai et al., 1995; Honse et al., 2004).

O antagonismo do receptor NMDA promovido pelo etanol, dentre outras ações, é responsável pela inibição da potenciação de longo prazo (LTP, do inglês “long-term potentiation”), tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Morrisett e Swartzwelder, 1993), promovendo graves conseqüências nos processos de desenvolvimento do SNC, aprendizado e memória (Gonzáles e Jaworski, 1997). Contudo, o tratamento crônico com etanol resulta em um bloqueio de longo-prazo sobre os receptores NMDA, levando a alterações estruturais, que culminam em “up-regulation” compensatória deste sistema (Chandler, 2003; Honse et al., 2004).

Além das modificações na função dos receptores NMDA e GABAA (Chandler et al., 1998), o etanol também interage com outros sistemas de neurotransmissores, dentre eles o sistema dopaminérgico (Cohen, 1997) e o opióide (Weiss e Porrino, 2002). O etanol aumenta, de maneira dose-dependente, o disparo de neurônios dopaminérgicos das regiões A9 e A10 que se projetam, respectivamente, para o estriado e em estruturas límbicas, promovendo um aumento na liberação de dopamina nestas áreas (Carlsson e Lindqvist, 1973; Mereu et al., 1984; Gessa et al., 1985; Imperato e DiChiara, 1986; Appel et al., 2003). No mesmo sentido, a administração de etanol aumenta a concentração extracelular de endorfinas no núcleo accumbens, contribuindo para as propriedades de reforço do etanol (Weiss e Porrino, 2002).

Como sugerido para grande parte das drogas de abuso, a ação do etanol no sistema dopaminérgico mesolímbico, formado por neurônios dopaminérgicos que se originam na área tegmentar ventral (VTA) e se projetam para regiões prosencefálicas, como núcleo accumbens, córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (Nestler, 2001), e o conseqüente aumento na liberação de



dopamina no núcleo accumbens, uma importante área envolvida nas sensações prazerosas (Koob et al., 1998; Everitt e Wolf, 2002), parece mediar às propriedades de reforço e recompensa apresentadas pelo consumo de etanol (Tabakoff e Hoffmann, 1987; Wise e Bozarth, 1987; Koob, 1992; Risinger et al., 2000; Cunningham et al., 2000).

Além disso, manipulações na expressão de genes para os receptores dopaminérgicos, como também, metodologias com animais nocaute (KO) para estes receptores, mostram que camundongos KO para os receptores D1 e D2 de dopamina consomem menos, e apresentam uma reduzida preferência condicionada de lugar ao etanol (El-Ghundi et al., 1998; Cunningham et al., 2000; Risinger et al., 2000).

Os sistemas de neurotransmissão serotoninérgico (Kelai et al., 2003), canabinóide (Hungund e Basavarajappa, 2000), colinérgico (Cardoso et al., 1999), adenosinérgico (Mailiard e Diamond, 2004), além das inúmeras cascatas de transdução de sinais, como os sistemas de segundos mensageiros (Ron e Jurd, 2005), também são afetados direta ou indiretamente pelo tratamento agudo ou repetido de etanol. Esta ampla variedade de sistemas envolvidos nos diferentes efeitos produzidos pelo etanol, constitui alvos potenciais para o desenvolvimento de novas farmacoterapias no tratamento do alcoolismo (Spanagel e Zieglgänsberger, 1997).

### **1.3. Sistema adenosinérgico x etanol**

O envolvimento do sistema adenosinérgico nas ações centrais do etanol foi inicialmente relatado no início da década de 80 (Dar et al., 1983; Proctor e Dunwiddie, 1984). No presente momento, um grande número de evidências tem mostrado a participação da adenosina em respostas celulares e comportamentais mediadas pelo etanol (Hack e Christie, 2003; Mailliard e Diamond, 2004). A cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, tem sido utilizada para reduzir os efeitos de intoxicação aguda ocasionados pelo etanol (Hasenfratz et al., 1993; Lorist e Tops, 2003).

Estudos têm proposto que o etanol estimula a sinalização adenosinérgica principalmente através de dois mecanismos: um envolve o metabolismo de etanol pelo fígado, que produz acetato, e este pode ser metabolizado formando adenosina no SNC (Carmichael et al., 1991; Kiselevski et al., 2003), e o outro, observado em culturas celulares, envolve a inibição de transportadores específicos de adenosina (Nagy et al., 1990; Krauss et al., 1993; Choi et al., 2004). Somente nos últimos anos, estudos têm mostrado que a maioria das drogas de abuso, dentre elas cocaína, opióides, canabinóides e etanol, causam alterações nas vias de sinalização mediadas pela adenosina em diversas estruturas encefálicas ligadas à etiologia da dependência (Hack e Christie, 2003).

A adenosina, um nucleotídeo purinérgico endógeno, está envolvida na modulação de diferentes processos fisiológicos de muitos sistemas, e tem sido implicada em processos normais (homeostáticos) e patofisiológicos, como epilepsia (Ahlijanian e Takemori, 1985), transtornos neurológicos (Popoli et al., 1997), isquemia cerebral (Ongini et al., 1997), além de processos neurodegenerativos como a doença de Parkinson (Hauber e Munkle, 1996; Gale e Martyn, 2003). Periféricamente, a adenosina tem efeitos marcantes sobre o sistema cardiovascular, além de modular respostas inflamatórias e imunológicas, renais, respiratórias, entre outras (para revisão ver Kaiser e Quinn, 1999; Ribeiro et al., 2003).

A adenosina não corresponde a um neurotransmissor clássico, uma vez que não existem evidências de armazenamento vesicular e, tampouco, da liberação dependente de cálcio (processo conhecido como exocitose), sendo, portanto, classificado como um neuromodulador (Hack e Christie, 2003). As concentrações basais de adenosina são dependentes do equilíbrio entre múltiplos mecanismos que regulam sua produção, liberação, recaptção e metabolismo (para revisão ver Latini e Pedata, 2001; Dunwiddie e Masino, 2001). Nas sinapses centrais, a concentração basal de adenosina é relativamente baixa, entre 30 e 300 nM (Dunwiddie e Diao, 1994; Fredholm et al., 1999).

No SNC, a adenosina pode ser formada intracelularmente através da degradação do 5'-AMP (5-adenosina monofosfato) e então liberada via transportadores específicos de nucleosídeos, ou então pelo metabolismo rápido de nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) liberados no espaço extracelular (Dunwiddie et al., 1997; Latini e Pedata, 2001). Desta maneira, a formação de adenosina pode ocorrer tanto fora, quanto dentro das células, e depende da atividade de determinadas enzimas, conhecidas como nucleotidasas e fosfodiesterases. As nucleotidasas podem defosforilar virtualmente apenas nucleotídeos de adenina formando 5'-AMP que, por sua vez, é novamente defosforilado pela 5'-nucleotidase, dando origem a adenosina (Dunwiddie et al., 1997; Cunha et al., 1998, 2000; Zimmermann, 2000; Figura 2). Outro mecanismo é a formação de adenosina a partir do metabolismo intracelular do AMPc. Embora este processo tenha sido mostrado indiretamente, tanto a adenosina per se quanto o 5'-AMP podem ser transportados para o espaço extracelular via transportadores específicos de nucleosídeos (Craig et al., 1994).

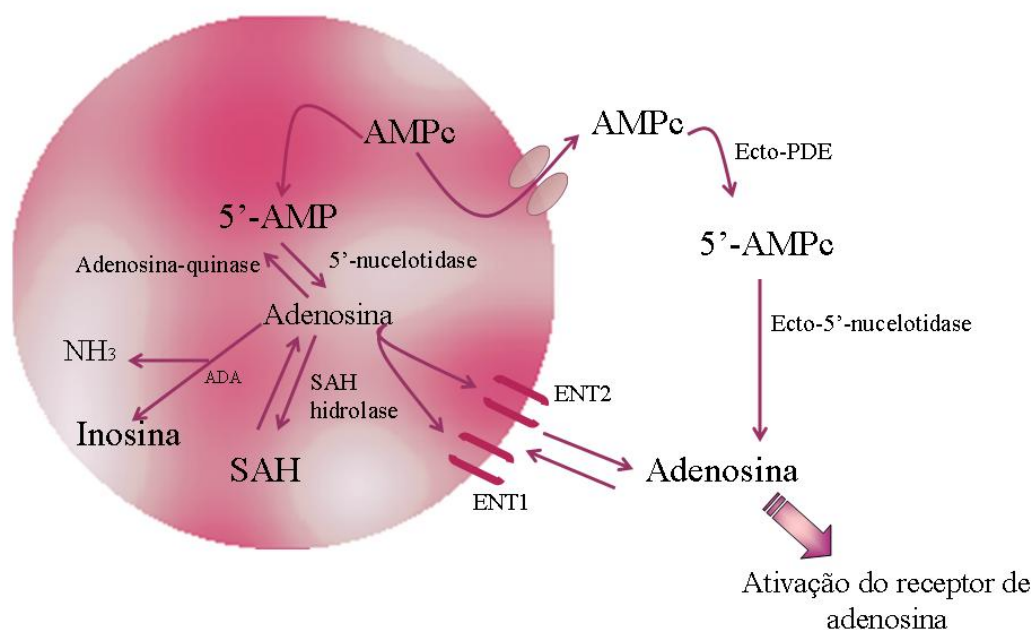


Figura 2. Esquema simplificado dos mecanismos intracelulares e extracelulares responsáveis pela formação e regulação metabólica da adenosina. AMPc, monofosfato de 3',5'-adenosina cíclico; 5'-AMP, monofosfato 5'-adenosina; ENT1, transportador responsável pelo transporte passivo; ENT2, transportador responsável pelo transporte passivo; PDE, fosfodiesterase; SAH, S-adenosil homocisteína. Adaptado de Hack e Christie (2003).

Os níveis de adenosina extracelular são rapidamente regulados pela atividade de transportadores específicos de nucleosídeos, que modulam a recaptção de adenosina para o interior da célula, visto que o bloqueio destes transportadores aumenta os níveis basais de adenosina (Crawley et al., 1983; Ballarin et al., 1991; Mailliard e Diamond, 2004). O transporte bidirecional de adenosina é mediado principalmente por duas classes de transportadores funcionalmente distintos: o transporte ativo dependente de  $\text{Na}^+$ , que direciona a captação de adenosina contra um gradiente de concentração, e o transporte facilitado (passivo), encontrado predominantemente no SNC, que possibilita o transporte de adenosina em ambas as direções, dependendo do gradiente de concentração (Thorn e Jarvis, 1996; Latini e Pedata, 2001).

Em condições fisiológicas, o fluxo de adenosina através do transporte passivo ocorre para o interior da célula, uma vez que a concentração intracelular de adenosina é menor do que no espaço extracelular. Contudo, estes transportadores podem regular o efluxo de adenosina em condições em que seus níveis intracelulares estão elevados (Brundege e Dunwiddie, 1998; Dunwiddie e Masino, 2001). Por outro lado, após sua captação a adenosina pode ser metabolizada tanto por fosforilação, mediada pela adenosina quinase, quanto por deaminação, mediada pela adenosina deaminase (ADA), formando 5'-AMP e inosina, respectivamente (Hack e Christie, 2003). A adenosina ainda pode ser metabolizada para S-adenosil homocisteína (SAH) via uma reação reversível catalisada pela SAH hidrolase (Latini e Pedata, 2001; Dunwiddie e Masino, 2001) (Figura 2).

A influência da adenosina sobre os níveis encefálicos de AMPc forneceu a primeira evidência molecular sobre a função de seus receptores e sua diferenciação em subtipos. As respostas neurais mediadas pela ativação destes receptores são dependentes da formação, difusão entre os espaços intracelulares e extracelulares, e degradação da adenosina (Dunwiddie, 1985).

Além disso, técnicas de biologia molecular têm demonstrado que os efeitos fisiológicos da adenosina são transduzidos através de receptores acoplados à proteína G ( $\alpha<\beta<\gamma$ ) e subsequente interação com diversos sistemas efetores que incluem além do AMPc, GMPc (guanodina

monofosfato cíclico), fosfodiesterases, fosfolipase A2, canais iônicos de Ca<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>, entre outros (Olah e Stiles, 1995; Birnbaumer e Birnbaumer, 1995; Lorist e Tops, 2003). Desta maneira, as respostas neurais mediadas pela adenosina dependem do tipo e quantidade de transportadores e receptores presentes nas diversas regiões encefálicas.

Até o presente momento, quatro subtipos de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), codificados por quatro genes distintos, têm sido clonados e caracterizados em diferentes espécies de mamíferos, incluindo humanos e camundongos (Olah e Stiles, 1995; Fredholm et al., 2001). Os receptores A1 e A3 interagem com proteínas G inibitórias (Gi/o) sensíveis à toxina pertussis, promovendo uma inibição da atividade da enzima adenilato ciclase e, conseqüentemente, redução dos níveis de AMPc. Por outro lado, os receptores A2 (A2A e A2B) estão acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs ou Golf), levando a um aumento na atividade da enzima adenilato ciclase e nos níveis de AMPc (Daly et al., 1983; Feoktistov e Biaggioni, 1997; Kull et al., 2000). A Tabela 1 mostra, resumidamente, os subtipos de receptores de adenosina presentes no SNC.

Os receptores A1 estão presentes em quase todas as regiões encefálicas, e medeiam as suas ações inibitórias, sendo predominantemente localizados nos terminais pré-sinápticos, modulando a liberação de uma variedade de neurotransmissores (Fredholm e Dunmiedie, 1988; Hack e Christie, 2003). Estes receptores são expressos em concentrações elevadas em estruturas como o hipocampo, córtex cerebral e cerebelar e núcleos talâmicos (Goodman e Snyder, 1982; Fastbom et al., 1987; Deckert et al., 1988), enquanto que, níveis moderados são encontrados no caudado-putamen e núcleo accumbens (Lorist e Tops, 2003). Por outro lado, os receptores A2A, presentes principalmente nas espinhas dendríticas das células neurais, apresentam uma localização mais limitada que os receptores A1, sendo encontrados em altas concentrações em regiões encefálicas ricas em dopamina, como o estriado, o núcleo accumbens e o tubérculo olfatório, apresentando reduzida expressão em outras áreas do SNC (Ongini e Fredholm, 1996; Moreau e Huber, 1999).

Tabela 1. Características dos subtipos de receptores de adenosina presentes no SNC.

| <b>Receptor</b> | <b>CE<sub>50</sub><br/>Adenosina</b> | <b>Transdução de sinal</b>  | <b>Acoplado a<br/>proteína G</b> | <b>Efeitos<br/>neurofisiológicos</b>  | <b>Distribuição</b>                             |
|-----------------|--------------------------------------|---|----------------------------------|---|---|
| A <sub>1</sub>  | ≈ 70 nM                              | ↓ Adenilato ciclase<br>↑ GIRKs<br>↑ Canais de Ca <sup>2+</sup><br>↑ PLC                 | Gi e Go                          | ↓ Liberação de neurotransmissores<br>Hiperpolarização                       | Amplamente distribuído                          |
| A <sub>2A</sub> | ≈ 150 nM                             | ↑ Adenilato ciclase<br>↓/↑ Canais de Ca <sup>2+</sup><br>↑ MAPK                         | Gs e Golf                        | ↓/↑ Liberação de neurotransmissores<br>↑ AMPc                               | Tubérculo olfatório; estriado e núcleo acumbens |
| A <sub>2B</sub> | ≈ 5100 nM                            | ↑ Adenilato ciclase<br>↑ PLC<br>↑ IP <sub>3</sub><br>↑ MAPK                             | Gs                               | ↑ AMPc  | Amplamente distribuído (baixos níveis)          |
| A <sub>3</sub>  | ≈ 6500 nM                            | ↓ Adenilato ciclase<br>↑ PLC<br>↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub><br>↑ IP <sub>3</sub> | Gi e Gq                          | ↓ Inibição mediada mGluR<br>↓ Inibição sináptica mediada por A <sub>1</sub> | Amplamente distribuído (baixos níveis)          |

Abreviações: ↑, ativa; ↓, inibe; GIRK, canal de potássio acoplado à proteína G; PLC, fosfolipase C; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; mGluR, receptor glutamatérgico do tipo metabotrópico. Adaptado de Hack e Christie, 2003.

Muitas evidências têm mostrado o envolvimento direto dos receptores de adenosina em comportamentos relacionados à ansiedade e emocionalidade (Imaizumi et al., 1994; Millan, 2003). Camundongos com deleção gênica dos receptores A<sub>1</sub> apresentam um aumento nos níveis de ansiedade (Johansson et al, 2001; Giménez-Llort et al, 2002; Lang et al, 2003), e as ações ansiogênicas dos antagonistas destes receptores, como a cafeína, tanto em roedores quanto em humanos, têm sido geralmente atribuído ao bloqueio dos receptores A<sub>1</sub> (Pellow et al, 1985;

McCloskey et al, 1990; Jain et al, 1995; Florio et al, 1998). De maneira contrária, a administração de agonistas dos receptores A1 promove respostas tipo-ansiolíticas em vários modelos animais (Imaizumi et al., 1994; Jain et al., 1995).

Embora nenhuma evidência consistente tenha sido obtida, até o presente momento, para os efeitos tipo-ansiolíticos induzidos pela ativação dos receptores A2A (Jain et al, 1995; El Yacoubi et al, 2000), muitos autores tem mostrado que camundongos nocautes para estes receptores, parecem ser mais “ansiosos” e “agressivos” do que os respectivos camundongos controles (Ledent et al., 1997). Além disso, estudos clínicos têm encontrado uma significativa associação entre polimorfismos no gene do receptor A2A e transtornos de pânico, além do fato de indivíduos relatarem quadros de ansiedade após o tratamento agudo com cafeína (Alsene et al, 2003; Hamilton et al, 2004). Apesar destas evidências, nenhum estudo até o presente momento investigou o envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito ansiolítico induzido pelo etanol.

Outros estudos sugerem que os receptores de adenosina podem modular muitos dos sinais da abstinência ao etanol, como tremores e convulsões (Jain et al., 1995; Zeraati et al., 2006). Concas e colaboradores (1994) descreveram uma significativa redução da síndrome de abstinência ao etanol após o tratamento com o agonista seletivo do receptor A1, CCPA, enquanto a ausência dos receptores A2A ou seu bloqueio crônico com ZM241385 resulta em uma redução das convulsões induzidas pela abstinência ao etanol em camundongos (El Yacoubi et al., 2001).

Além disso, o tratamento com o agonista seletivo dos receptores A1, R-PIA, bem como com o agonista seletivo do receptor A2A, CGS 21680, tem produzido resultados similares ao atenuar a abstinência do etanol em camundongos (Kaplan et al., 1999). Contudo, alguns estudos (Gatch et al., 1999) têm produzido resultados conflitantes entre o sistema adenosinérgico e os elevados níveis de ansiedade observados durante a abstinência ao etanol. Portanto, são necessários estudos mais abrangentes para uma melhor compreensão do papel dos receptores de adenosina nos sinais observados após a retirada do etanol.

Paralelamente, pouco é conhecido sobre a participação dos receptores para adenosina no desenvolvimento da tolerância ao etanol. Estudos experimentais demonstram que animais desafiados com etanol após o tratamento crônico com agonistas do receptor A<sub>1</sub>, e vice-versa, mostraram perda reduzida da coordenação motora, quando comparados com animais controle (Dar e Clark, 1992; Dar, 1993), sugerindo o desenvolvimento de tolerância cruzada entre estes dois compostos (Dar, 1993). Entretanto, os mecanismos pelo qual o sistema adenosinérgico modula o desenvolvimento de tolerância ao etanol ainda permanecem obscuros.

Além disso, tem sido bem documentado que a cafeína, além de outros compostos que atuam sobre o sistema adenosinérgico, apresenta propriedades reforçadoras e motivacionais em humanos (Griffiths e Mumford, 1995) e roedores (Steigerwald et al., 1988; Zarrindast e Moghadamnia, 1997; Patkina e Zvartau, 1998). Neste sentido, muitos estudos mostram que a cafeína pode produzir tanto preferência (doses baixas), quanto aversão de lugar (doses moderadas e altas), quando testada no paradigma da preferência condicionada de lugar (Brockwell et al., 1991; Brockwell e Beninger, 1996; Patkina e Zvartau, 1998). Estudos recentes têm mostrado que os receptores de adenosina modulam a preferência condicionada de lugar induzida pela cocaína (Poleszak e Malec, 2002) e anfetamina (Poleszak e Malec, 2003) em ratos, sugerindo uma importante participação do sistema adenosinérgico no reforço positivo de drogas de abuso. Todavia, poucos estudos têm investigado o envolvimento do sistema adenosinérgico nos processos reforçadores e motivacionais induzidos pelo etanol em roedores.

Embora o repertório comportamental dos animais de laboratório seja significativamente diferente dos humanos, e fatores inerentes contribuïrem na suscetibilidade individual para o abuso do etanol e alcoolismo, a utilização de modelos experimentais tem contribuïdo enormemente para a descoberta de novos alvos moleculares e sistemas neurais, além de caracterizar de fatores genéticos e ambientais que influenciam o desenvolvimento da dependência ao etanol.



A capacidade de interação do etanol com múltiplos sistemas de neurotransmissores, associado com os efeitos neuromodulatórios da adenosina tanto in vivo quanto in vitro, tem fornecido um enorme interesse no potencial terapêutico deste sistema para o tratamento do alcoolismo. Contudo, relativamente pouco se sabe sobre o envolvimento deste sistema em comportamentos relacionados à ansiedade após tratamento agudo ou após a abstinência do etanol, bem como nas respostas neuroadaptativas verificadas após a exposição repetida, como o desenvolvimento de tolerância e reforço positivo do etanol, supostamente implicados na iniciação, manutenção e recaída ao consumo de etanol em modelos animais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

- ✓ Investigar o envolvimento do sistema adenosinérgico nas propriedades ansiolíticas da administração aguda de etanol, ansiogênicas da retirada de etanol (ressaca), bem como no desenvolvimento da tolerância rápida e nas propriedades motivacionais induzidas pela administração repetida de etanol.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Verificar o papel dos receptores de adenosina A1 e A2A no efeito ansiolítico produzido pela administração aguda de etanol em camundongos testados no labirinto em cruz elevado;
- ✓ Investigar o efeito de agonistas dos receptores A1 e A2A na ansiedade experimental induzida pela abstinência aguda (ressaca) ao etanol em camundongos testados no labirinto em cruz elevado;
- ✓ Avaliar o papel de antagonistas dos receptores A1 e A2A no desenvolvimento da tolerância rápida na perda da coordenação motora induzida pelo etanol em camundongos testados no rota-rod;
- ✓ Investigar o efeito do antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina cafeína nas fases de aquisição e expressão do reforço positivo ao etanol em camundongos avaliados no teste da preferência condicionada de lugar.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos albinos suíços machos, pesando entre 30–40 g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (42 x 34 x 17 cm) com no máximo 25 animais, e mantidos no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sob um ciclo claro-escuro de 12 horas (período claro a partir das 7:00 h) e livre acesso a comida e água. Os animais foram transportados do Biotério para a sala de experimento uma hora antes dos procedimentos, que foram todos realizados entre as 10:00 e 18:00 h. Todos os experimentos realizados no presente estudo estão de acordo com o guia do Comitê de Ética da UFSC para o Uso de Animais (Nº 258/CEUA/UFSC), que segue os “Princípios e cuidados com animais de laboratório” da publicação do NIH nº 85-23.

#### **3.2. Drogas e reagentes**

O etanol (Merck, Brasil) foi diluído em salina (NaCl 0,9%) na concentração, dependendo do protocolo experimental, de 12% p/v para as doses 0,6; 1,2 ou 2,4 g/kg, de 14% p/v para as doses 0,5; 1,0; 2,0 ou 2,25 g/kg e de 20% p/v para a dose 4,0 g/kg.

A adenosina (Sigma Chemical Co., USA; 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg), agonista não-seletivo dos receptores de adenosina, bem como os agonistas seletivos do receptores de adenosina A1 e A2A, 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina (CCPA) (Tocris Cookson, USA; 0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg) e N6-[2-(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil)etil]adenosina (DPMA) (Tocris Cookson, USA; 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg), respectivamente, além dos antagonistas, não-seletivo - cafeína (Sigma Chemical Co., USA; 3,0; 10,0; 20,0 ou 30,0 mg/kg), A1 seletivo - 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX) (Tocris Cookson, USA; 3,0 ou 6,0 mg/kg) e A2A seletivo - 4-(2-[7-amino-2-{2-

furil} {1,2,4} triazolo- {2,3-a} {1,3,5} triazin-5-il-amino] etil)fenol (ZM241385) (Tocris Cookson, USA; 0,5; 1,0 ou 3,0 mg/kg), foram dissolvidos em salina com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

A solução controle consistiu de salina para etanol, e de salina com 5% de DMSO para adenosina, CCPA, DPMA, cafeína, DPCPX e ZM241385. Todas as doses das drogas, selecionadas de acordo com estudos piloto e trabalhos prévios da literatura (Jain et al., 1995; Florio et al., 1998; El Yacoubi et al., 2000; Barbosa e Morato, 2001; Da Silva et al., 2001), foram administradas intraperitonealmente (i.p.), em volume de 0,1 ml por 10 g de peso corporal (com exceção do etanol, onde o volume administrado variou conforme a dose utilizada).

### **3.3. Modelos comportamentais**

#### **3.3.1. Labirinto em cruz elevado**

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para detectar efeitos tipo-ansiolíticos e/ou ansiogênicos de drogas administradas em camundongos (Lister, 1987). O aparelho foi construído em madeira coberta com fôrmica preta impermeável, e é constituído de dois braços cercados por paredes (braços fechados), colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de parede (braços abertos), estando o conjunto elevado 60 cm em relação ao assoalho (Figura 3). Cada braço, tanto os abertos quanto os fechados, apresenta 18 cm de comprimento por 6 cm de largura, sendo conectados por uma plataforma central (6 x 6 cm). Os experimentos foram conduzidos sob baixa intensidade de luz (12 lux).



Figura 3. Labirinto em cruz elevado utilizado para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Cada animal foi colocado no centro do labirinto com a face voltada para o braço fechado, onde foram observados por um período de 5 min. O efeito tipo-ansiolítico foi definido como um aumento na proporção de entradas nos braços abertos dividido pelo número de entradas totais nos braços (abertos e fechados), e o tempo de permanência nos braços abertos relativo ao tempo total de permanência em ambos os braços. A diminuição destes parâmetros indica um efeito tipo-ansio gênico. Quando um camundongo colocou as quatro patas em um braço, uma entrada foi quantificada. O número total de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida de atividade locomotora.

### **3.3.2. Campo aberto**

Para a avaliação da atividade locomotora dos camundongos, foi utilizado o teste do campo aberto, de acordo com a metodologia caracterizada por Holland e Weldon (1968). O aparelho

consiste em uma caixa de fórmica impermeável preta de 30 x 30 cm (dividido por linhas brancas em 9 quadrados de 10 x 10 cm) e paredes pretas de 15 cm (Figura 4). A iluminação no centro do campo aberto foi de 12 lux. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto onde foi registrado, por um período de 5 min, o número total de cruzamentos pelos quadrantes (locomoção horizontal) e o número de respostas de levantar (locomoção vertical).



Figura 4. Arena do teste do campo aberto utilizado para avaliação da atividade locomotora.

### **3.3.3. Rota-rod**

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rota-rod (Rotamex-V-EE/85, EUA), controlado por um sistema computacional (Columbus Instruments Computer-Counter Interface, OH, EUA). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico dividida em quatro compartimentos com uma barra rotacional entre eles, que pode girar com velocidade constante ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. Abaixo da barra rotatória, localiza-se um sistema fotoelétrico, que permite 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 de dados (Figura 5).



Figura 5. Rota-rod utilizado para avaliação da coordenação motora.

Os animais foram treinados sob aceleração contínua (1 rpm/s) em sessões de 1 min, sendo que ao cair da barra rotatória recebiam um choque nas patas de 0,3 mA por 2 s, retornando em seguida para a sua caixa. A latência (s) para a queda dos animais da barra rotatória (que corresponde à velocidade rotacional da barra) foi quantificada como desempenho motor. Animais que, ao longo de 15 treinos (6 treinos/dia), não apresentaram um desempenho motor entre 20-40 s foram descartados (aproximadamente 10%). Após a seleção, grupos experimentais e controle foram formados respeitando o peso corporal e o desempenho motor na última sessão. Com este procedimento, os animais apresentavam um desempenho motor basal semelhante em ambos os dias para todos os grupos.

### **3.3.4. Preferência condicionada de lugar**

Os experimentos de preferência de lugar foram realizados em caixas de acrílico retangulares (54 x 15 x 15 cm), divididas por portas de guilhotina em dois compartimentos de iguais dimensões (22 x 15 cm), separadas por um compartimento central (10 x 15 cm) (Figura 6). Um dos compartimentos tem paredes pretas com listras brancas horizontais, sendo a textura do chão gradeada, enquanto o compartimento oposto tem paredes brancas com listras pretas verticais e a textura do chão lisa. O compartimento central tem paredes e chão marrons. Ambos os compartimentos têm aproximadamente a mesma iluminação (5 lux) e foram limpos com solução alcoólica de 10% após a exposição de cada animal no aparelho.

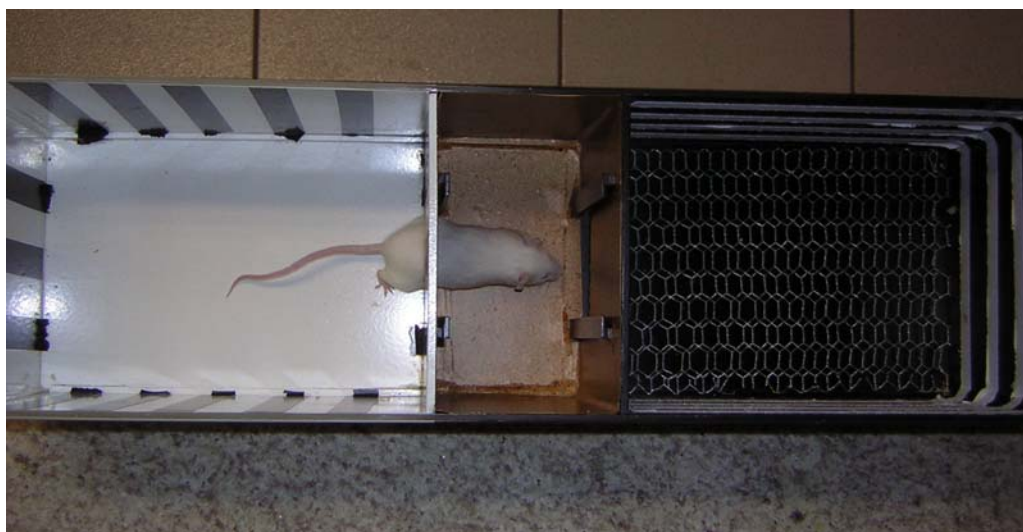


Figura 6. Caixa de condicionamento de lugar utilizado para a avaliação de propriedades reforçadoras de drogas.

Cada experimento consistiu de três fases: pré-condicionamento (2 dias), condicionamento (4 dias) e pós-condicionamento (1 dia). Durante a fase de pré-condicionamento, todos os animais foram colocados no compartimento central, com livre acesso aos três compartimentos por 10 min. Este mesmo procedimento foi repetido 2 h depois. O tempo de permanência (em segundos) dos animais em cada compartimento foi avaliado no dia seguinte durante 15 min (pré-teste), definindo o nível de preferência basal dos animais por cada ambiente/contexto. A metodologia experimental



empregada neste estudo foi o paradigma do condicionamento de lugar conhecido como unbiased (i.e., sem viés), onde as condições experimentais são selecionadas para resultar em uma preferência balanceada dos animais para ambos os compartimentos durante o pré-teste (Cunningham et al., 2003; Kuzmin et al., 2003). Neste sentido, os animais que permaneceram acima de 85% em um dos dois compartimentos foram excluídos do experimento.

A fase de condicionamento consistiu de duas sessões diárias de 25 min durante 4 dias consecutivos (total de 8 sessões: 4 com solução controle e 4 com etanol). Em cada um dos quatro dias de condicionamento, camundongos foram tratados com salina (i.p.) e, imediatamente após, foram confinados em um dos compartimentos por 25 min (primeira sessão diária de condicionamento). Duas horas depois, na segunda sessão diária de condicionamento, os animais foram tratados com etanol (0,5; 1,0 ou 2,0 g/kg, i.p.) ou salina (i.p.), e confinados por 25 min no compartimento oposto à primeira sessão. O grupo controle recebeu salina (i.p.) em ambos os compartimentos. Todos os grupos foram contrabalançados durante a sessão de condicionamento nos compartimentos, ou seja, metade dos animais do grupo recebeu salina (ou etanol) no compartimento com paredes pretas e listras brancas horizontais e chão gradeado, enquanto que a outra metade recebeu etanol (ou salina) no compartimento oposto.

O teste de pós-condicionamento foi conduzido 24 h após a última sessão de condicionamento. Durante este teste, camundongos em um estado livre da droga (exceto nos experimentos que avaliaram a expressão da preferência condicionada de lugar) foram colocados no compartimento central com livre acesso aos compartimentos do aparelho, e o tempo de permanência (s) de cada animal em cada compartimento foi quantificado durante 15 min (pós-teste). A diferença do tempo de permanência no compartimento associado com etanol durante o pós-teste (pós-condicionamento) versus o pré-teste (pré-condicionamento) foi utilizada como medida de preferência de lugar induzido pela droga. Nos experimentos controle (camundongos condicionados com salina em ambos os compartimentos), o compartimento utilizado como referência para a

análise da preferência de lugar foi o compartimento utilizado na segunda sessão de condicionamento com salina.

### **3.4. Procedimentos experimentais**

#### *3.4.1. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no efeito tipo-ansiolítico do etanol no labirinto em cruz elevado*

Para investigar a participação dos receptores A1 e A2A no efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol em camundongos testados no labirinto em cruz elevado, foram administradas doses “não-ansio-gênicas” (selecionadas após a realização de estudos piloto) dos antagonistas adenosinérgicos, cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A1, 3,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista do receptor A2A, 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.), 15 min antes do tratamento com etanol (1,2 g/kg, i.p.). A seguir, 15 min após este tratamento, os animais foram colocados no centro do labirinto em cruz elevado onde os parâmetros comportamentais (descritos anteriormente) foram registrados por um período de 5 min.

Em outro experimento, para investigar uma possível interação sinérgica entre a ativação do receptor A1 e o etanol em respostas tipo-ansiolíticas observadas em camundongos testados no labirinto em cruz elevado, foi administrada uma dose selecionada de CCPA (agonista do receptor A1, 0,125 mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção aguda de etanol (0,6 g/kg, i.p.), e 15 min após este tratamento, os animais foram testados no labirinto em cruz elevado.

#### *3.4.2. Comportamento tipo-ansio-gênico induzido pela abstinência aguda (ressaca) do etanol em camundongos*

Para investigar um possível comportamento tipo-ansio-gênico durante a ressaca do etanol ao longo do tempo, grupos independentes de camundongos foram testados no labirinto em cruz elevado 0,5, 6, 12, 18 ou 24 h após a administração aguda de etanol (4,0 g/kg, i.p.) ou salina (i.p.).

*3.4.3. Dosagem sanguínea de etanol durante a ressaca*

As concentrações sanguíneas de etanol foram determinadas, em grupos distintos de animais, em intervalos de 0,5, 2, 4, 6 e 12 h após a injeção aguda de etanol (4 g/kg, i.p.). A dosagem sanguínea foi realizada pelo método da cromatografia gasosa utilizando o aparelho Thermo Quest Autosystem. Uma amostra de 0,5 ml de sangue, coletada da cauda, foi misturada com 0,5 ml de uma solução 1,6 g/l de n-propranolol, utilizado como padrão interno. As amostras foram incubadas por 7 min a 75°C. As cromatografias foram registradas e os cálculos básicos realizados pelo programa de computador Chrom-card.

*3.4.4. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol*

Para investigar o papel dos receptores A1 e A2A no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol, camundongos foram submetidos ao labirinto em cruz elevado 18 h (baseado no experimento anterior) após a administração de etanol (4,0 g/kg, i.p.), sendo que grupos independentes de animais foram tratados previamente (30 min antes dos testes comportamentais) com agonistas dos receptores de adenosina, adenosina (agonista não-seletivo, 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.), CCPA (agonista do receptor A1, 0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista do receptor A2A, 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.).

Um experimento subsequente foi realizado para investigar se os efeitos produzidos pelo CCPA, no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol, estão realmente relacionados à ativação dos receptores A1. Para isso, foi administrada uma dose selecionada (baseado em experimentos piloto) do antagonista seletivo do receptor A1 DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.), 15 min antes da injeção de CCPA (0,05 mg/kg, i.p.). Os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado 18 h após o tratamento com etanol (4,0 g/kg, i.p.). DPCPX e CCPA foram administrados, respectivamente, 30 e 15 min antes do teste.

*3.4.5. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A na tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol*

Para investigar o papel dos receptores de adenosina A1 e A2A no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, diferentes grupos de camundongos treinados foram pré-tratados com cafeína (antagonista não-seletivo, 3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A1, 3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista do receptor A2A, 0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.). Dez min depois, cada grupo foi novamente dividido em dois, e cada subgrupo recebeu etanol (2,25 g/kg, i.p.) ou salina (i.p.). Então, os animais foram testados no rota-rod após 20 min. Vinte e quatro horas depois, todos os grupos (incluindo os controles) receberam um dose desafio de etanol (2,25 g/kg, i.p.), e foram testados no rota-rod 20 min após este tratamento, para avaliar o desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora.

*3.4.6. Efeito do antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina cafeína nas fases de aquisição e expressão da preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol em camundongos*

Para investigar o envolvimento dos receptores de adenosina na aquisição da preferência condicionada de lugar ao etanol, camundongos foram tratados durante a sessão de condicionamento (4 dias consecutivos) com cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0, 20,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) ou salina (i.p.), 10 min antes da segunda sessão da fase de condicionamento (administração intraperitoneal de 2,0 g/kg de etanol ou salina). A avaliação do efeito reforçador foi realizada 24 h após a última sessão de condicionamento, na ausência de tratamento, onde foi registrado o tempo de permanência dos animais nos compartimentos da caixa de condicionamento (teste de pós-condicionamento), conforme procedimento já descrito anteriormente.

Para avaliar o envolvimento dos receptores de adenosina na expressão da preferência condicionada de lugar ao etanol, os experimentos foram realizados como descritos acima (administração de 2,0 g/kg de etanol durante as sessões de condicionamento), exceto que a cafeína

(10,0 ou 20,0 mg/kg, i.p.) ou salina (i.p.) foi somente administrada 10 min antes do teste de pós-condicionamento.

### **3.5. Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas entre as médias dos grupos foram inicialmente realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste post-hoc de Newman-Keuls ou LSD (dependendo do protocolo experimental). A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico “Statistic 5.0 ®”.

## 4. RESULTADOS

### *4.1. Efeito do tratamento agudo com etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado*

Os resultados da administração de etanol (0,6; 1,2 ou 2,4 g/kg, i.p.) nos animais avaliados no labirinto em cruz elevado estão ilustrados na Figura 7. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,24) = 25,54$ ;  $p < 0,0001$ ], bem como na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,24) = 7,68$ ;  $p < 0,001$ ], sem diferenças estatisticamente significantes com relação ao número de entradas nos braços fechados [ $F(3,24) = 1,61$ ;  $p = 0,21$ ].

O teste subsequente de Newman-Keuls indicou que o etanol nas doses de 1,2 e 2,4 g/kg, aumentou significativamente a exploração dos animais nos braços abertos do labirinto, sem alterações significativas na frequência de entradas nos braços fechados, demonstrando um efeito tipo-ansiolítico destas doses de etanol (Figura 7).

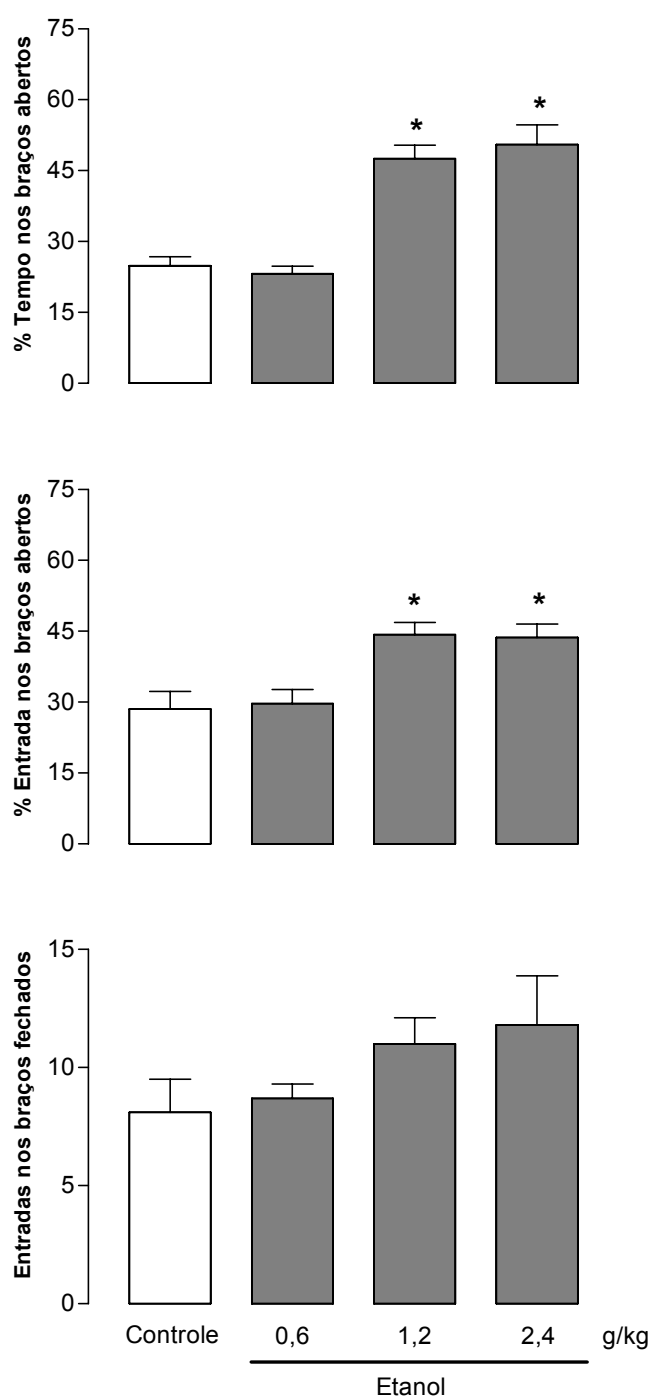


Figura 7. Efeito do tratamento agudo com etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com etanol (0,6; 1,2 ou 2,4 g/kg) ou salina, e 15 min depois, testados no labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0.05$  comparado com o grupo controle (salina) (teste de Newman-Keuls).

*4.2. Efeito de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina A1 e A2A no labirinto em cruz elevado e campo aberto*

Os resultados da administração aguda de adenosina (agonista não-seletivo dos receptores de adenosina, 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.), CCPA (agonista do receptor A1, 0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista do receptor A2A, 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.), em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(9,63) = 6,61$ ;  $p < 0,0001$ ] e na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(9,63) = 4,83$ ;  $p < 0,0001$ ], sem diferença significativa para o número de entradas nos braços fechados [ $F(9,63) = 1,26$ ;  $p = 0,28$ ].

As comparações post-hoc (Newman-Keuls) indicaram que somente a maior dose testada do agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA (0,25 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente a exploração dos animais pelos braços abertos do labirinto ( $p < 0,05$ ), sem alterar significativamente o número de entradas nos braços fechados, demonstrando um efeito tipo-ansiolítico do CCPA nesta dose (Tabela 2).



Tabela 2. Efeito da administração de agonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com adenosina (agonista não-seletivo, 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.), CCPA (agonista do receptor A1, 0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista do receptor A2A, 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.), e 30 min depois, testados no labirinto em cruz elevado.

| <b>Tratamento<br/>(mg/kg, i.p.)</b> | <b>% TBA</b> | <b>% EBA</b> | <b>EBF</b> | <b>N</b> |
|-------------------------------------|--------------|--------------|------------|----------|
| Controle                            | 29,9 ± 3,8   | 37,1 ± 2,4   | 9,2 ± 0,8  | 8        |
| Adenosina (1,0)                     | 28,7 ± 4,1   | 34,9 ± 3,1   | 9,8 ± 0,8  | 8        |
| Adenosina (5,0)                     | 23,4 ± 2,4   | 37,1 ± 3,8   | 8,8 ± 0,8  | 7        |
| Adenosina (10,0)                    | 28,9 ± 4,6   | 31,8 ± 3,1   | 9,3 ± 0,3  | 7        |
| CCPA (0,05)                         | 24,2 ± 1,4   | 29,3 ± 1,9   | 9,4 ± 0,6  | 7        |
| CCPA (0,125)                        | 28,7 ± 1,5   | 32,6 ± 1,5   | 10,8 ± 0,3 | 7        |
| CCPA (0,25)                         | 51,3 ± 2,5*  | 49,0 ± 1,6*  | 9,9 ± 0,4  | 8        |
| DPMA (0,1)                          | 27,8 ± 3,9   | 31,6 ± 3,8   | 9,6 ± 1,0  | 7        |
| DPMA (1,0)                          | 26,8 ± 2,7   | 31,4 ± 2,2   | 10,7 ± 1,0 | 7        |
| DPMA (5,0)                          | 23,9 ± 3,2   | 30,6 ± 2,2   | 8,3 ± 0,4  | 7        |

Os dados são representados como média ± E.P.M. de 7-8 animais por grupo.  
 % TBA, porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado;  
 % EBA, porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado;  
 EBF, número total de entradas nos braços fechados;  
 N, número de animais.

\*p<0,05 comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

Além disso, o tratamento agudo com estes agentes adenosinérgicos não alterou os parâmetros comportamentais analisados no campo aberto: número de quadrantes cruzados [F(9,62) = 0,87; p=0,15] e número de respostas de levantar [F(9,62) = 1,03; p=0,43] (Tabela 3).

Tabela 3. Efeitos da administração de agonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no campo aberto. Os animais foram tratados com adenosina (agonista não-seletivo, 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.), CCPA (agonista A1, 0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista A2A, 0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle, e 30 min depois, testados no campo aberto.

| <b>Tratamento<br/>(mg/kg, i.p.)</b> | <b>Número de<br/>cruzamentos</b> | <b>Respostas de<br/>levantar</b> | <b>N</b> |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| Controle                            | 72,9 ± 3,5                       | 22,0 ± 2,0                       | 8        |
| Adenosina (1,0)                     | 76,1 ± 5,7                       | 28,9 ± 3,3                       | 8        |
| Adenosina (5,0)                     | 66,3 ± 2,3                       | 26,8 ± 2,4                       | 7        |
| Adenosina (10,0)                    | 70,7 ± 4,2                       | 29,0 ± 4,3                       | 7        |
| CCPA (0,05)                         | 58,0 ± 1,8                       | 24,1 ± 1,4                       | 7        |
| CCPA (0,125)                        | 62,3 ± 2,2                       | 23,8 ± 2,7                       | 7        |
| CCPA (0,25)                         | 66,1 ± 2,3                       | 26,1 ± 2,9                       | 8        |
| DPMA (0,1)                          | 72,2 ± 6,6                       | 30,5 ± 3,8                       | 6        |
| DPMA (1,0)                          | 61,8 ± 5,9                       | 32,1 ± 5,2                       | 7        |
| DPMA (5,0)                          | 58,6 ± 2,2                       | 23,4 ± 3,1                       | 7        |

Os dados são representados como média ± E.P.M. de 6-8 animais por grupo.  
N, número de animais.

Os efeitos do tratamento agudo com cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A1, 3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista do receptor A2A, 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) estão ilustrados na Figura 8. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento tanto na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(6,49) = 10,58$ ;  $p < 0,0001$ ], quanto na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(6,49) = 8,64$ ;  $p < 0,0001$ ], sem diferença significativa para o número de entradas nos braços fechados [ $F(6,49) = 1,40$ ;  $p = 0,23$ ].

O teste post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que a maior dose de cafeína (30,0 mg/kg, i.p.) e DPCPX (6,0 mg/kg, i.p.) utilizadas no presente estudo, reduziram significativamente as porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos ( $p < 0,05$ ), indicando um efeito tipo-ansiolítico da cafeína e DPCPX nestas doses (Figura 8).

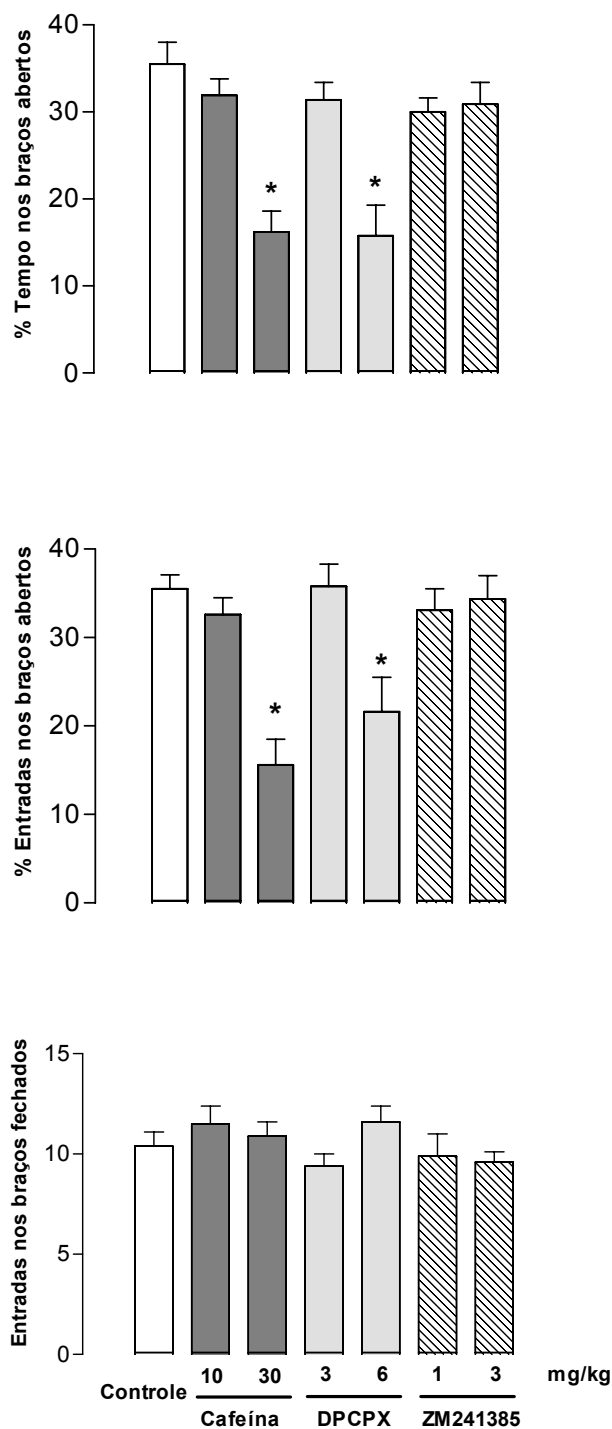


Figura 8. Efeitos do tratamento com antagonistas adenosinérgicos em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A1, 3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista A2A, 1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.), e 30 min depois, testados no labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

*4.3. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no efeito tipo-ansiolítico do etanol no labirinto em cruz elevado*

Os resultados da administração sistêmica de doses “não-ansiolíticas” de cafeína (antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina, 10,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista do receptor A1, 3,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista do receptor A2A, 1,0 mg/kg, i.p.) ou veículo (i.p.) sobre o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol (1,2 g/kg, i.p.) podem ser vistos na Figura 9. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(5,39) = 13,39; p < 0,0001$ ] e na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(5,39) = 10,36; p < 0,0001$ ], sem diferença significativa para o número de entradas nos braços fechados [ $F(5,39) = 1,58; p = 0,19$ ].

As comparações subseqüentes indicaram que a cafeína (10,0 mg/kg, i.p.) e o DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.), mas não o ZM241385 (1,0 mg/kg, i.p.), bloqueou o efeito tipo-ansiolítico do etanol (1,2 g/kg, i.p.) em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (teste de Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ) (Figura 9).

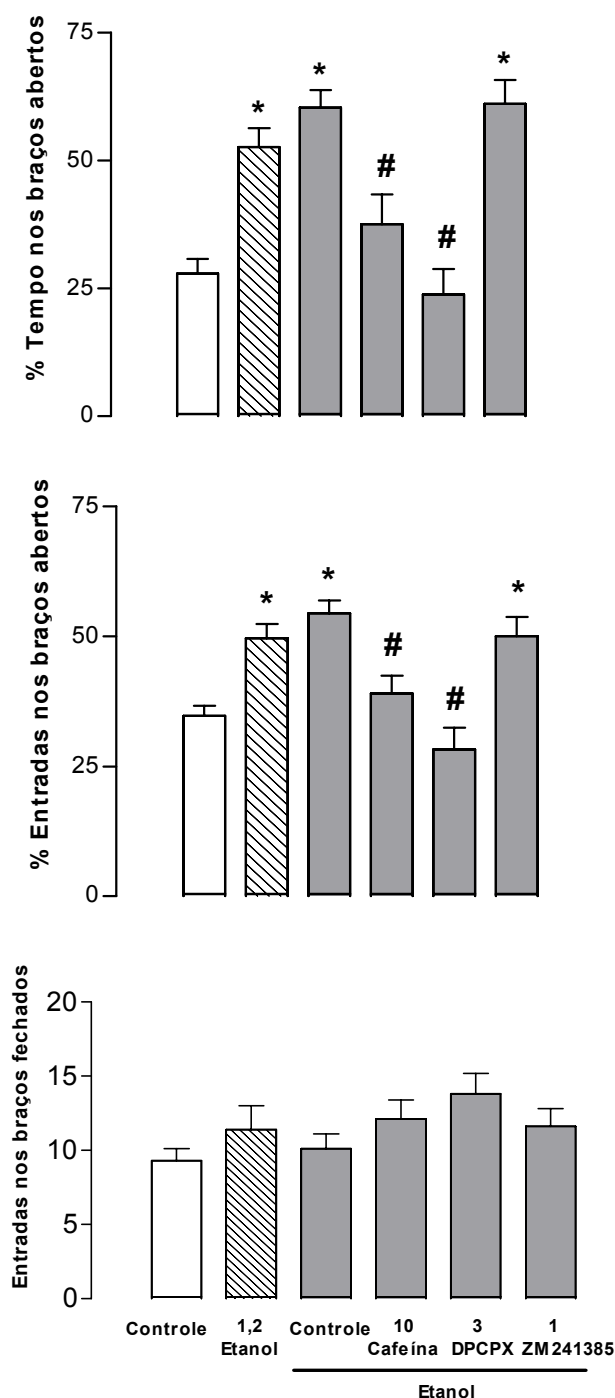


Figura 9. Efeito do tratamento com antagonistas adenosinérgicos no efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com doses “não-ansio-gênicas” de cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista A1, 3,0 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista A2A, 1,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) 15 min antes da injeção de etanol (1,2 g/kg, i.p.), e 15 min depois, testados no labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de 7-8 animais por grupo. \* $p < 0.05$  comparado com o grupo controle. # $p < 0.05$  comparado com o grupo que recebeu somente etanol (1.2 g/kg, i.p.) (teste de Newman-Keuls).

*4.4. Efeito da administração combinada de etanol e do agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado*

A Figura 10 ilustra os resultados da administração combinada do CCPA (0,125 mg/kg, i.p.) e etanol (0,6 g/kg, i.p.) em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,23) = 17,58$ ;  $p < 0,0001$ ], na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,23) = 34,28$ ;  $p < 0,0001$ ], sem alterações significativas quanto ao número de entradas nos braços fechados [ $F(3,23) = 1,51$ ;  $p = 0,24$ ].

O teste subsequente de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o agonista do receptor A1 CCPA (0,125 mg/kg, i.p.; sem efeito per se) 15 min antes da injeção de etanol (0,6 g/kg, i.p.; também sem efeito per se) aumentou significativamente a exploração dos animais nos braços abertos, sem alterações significativas na frequência de entradas nos braços fechados, sugerindo um efeito sinérgico entre o CCPA e do etanol sobre respostas tipo-ansiolíticas em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (Figura 10).

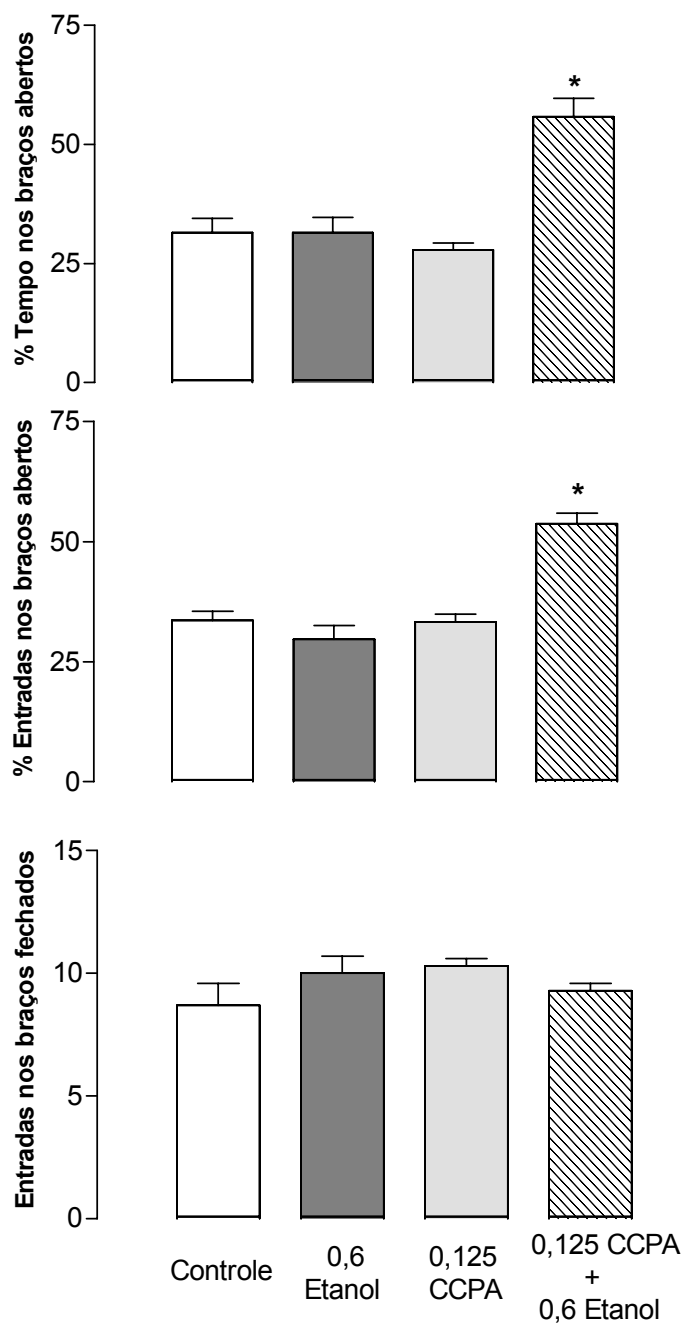


Figura 10. Efeito da administração combinada de etanol e do agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA sobre comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com CCPA (0,125 mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção de etanol (0,6 g/kg, i.p.), e 15 min depois, testados no labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8-9 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).



#### *4.5. Comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela abstinência aguda (ressaca) do etanol em camundongos*

A Figura 11 ilustra os efeitos da administração sistêmica de etanol (4,0 g/kg, i.p.) ou solução controle (salina, i.p.) em camundongos avaliados em diferentes intervalos de tempo (0,5, 6, 12, 18 ou 24 h) no labirinto em cruz elevado. A ANOVA revelou uma interação significativa entre o tratamento versus tempo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(4,62) = 2,85$ ;  $p < 0,05$ ], na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(4,62) = 3,32$ ;  $p < 0,05$ ] e no número de entradas nos braços fechados [ $F(4,62) = 5,82$ ;  $p < 0,001$ ].

O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que a administração de etanol (4,0 g/kg, i.p.) reduziu significativamente a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos 12 e 18 horas após a administração de etanol ( $p < 0,05$ ), demonstrando um efeito tipo-ansiosgênico da abstinência de etanol nestes tempos. Além disso, o grupo avaliado 0,5 h após o tratamento com etanol (4,0 g/kg, i.p.) no labirinto em cruz elevado, apresentou uma significativa diminuição na atividade locomotora quando comparado com o grupo controle, verificado pela redução do número total de entradas nos braços fechados ( $p < 0,05$ ) (Figura 11).

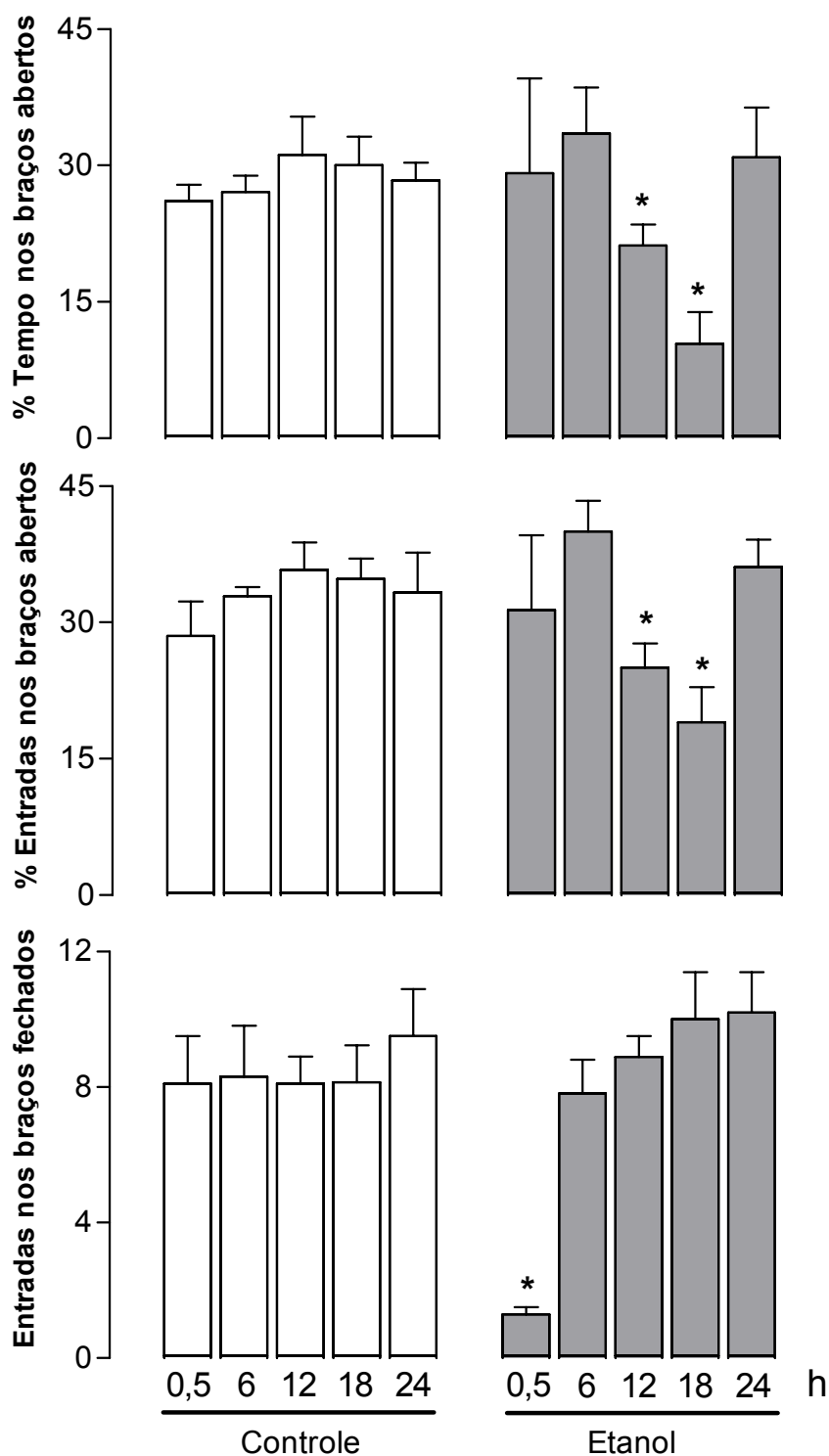


Figura 11. Comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela abstinência aguda (ressaca) do etanol em camundongos. Os animais foram tratados com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e testados no labirinto em cruz elevado após 0,5, 6, 12, 18 ou 24 h. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 7-8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle avaliado no mesmo tempo (teste de Newman-Keuls).

#### 4.6. Dosagem sanguínea de etanol durante a ressaca

A figura 12 ilustra a média das concentrações plasmáticas de etanol (mg/dL), 0,5; 2, 4, 6 ou 12 h após a administração aguda de etanol (4,0 g/kg, i.p.) em camundongos. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tempo [ $F(4,26) = 187,43$ ;  $p < 0,0001$ ].

As comparações post-hoc (teste de Newman-Keuls) indicaram que as concentrações plasmáticas de etanol diminuíram significativamente a partir de 4 h após a injeção de etanol ( $p < 0,05$ ). Além disso, o tempo de depuração estimado para a eliminação completa de etanol sérico foi de aproximadamente 8,5 h após o tratamento com etanol (Figura 12).

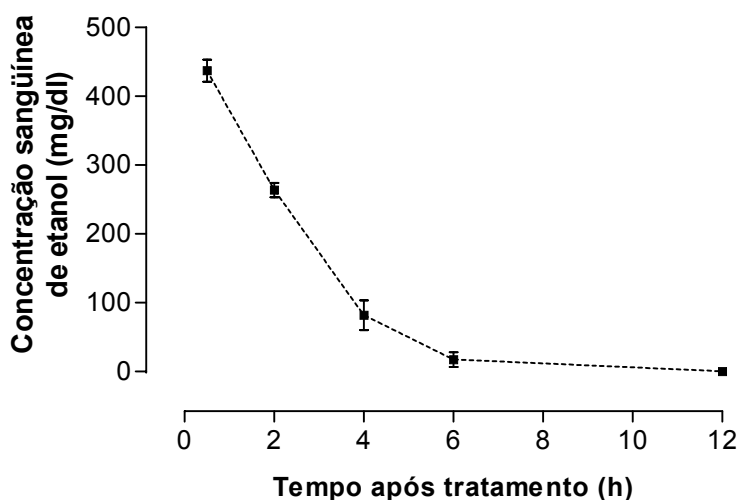


Figura 12. Concentração sanguínea de etanol (mg/dL) verificada em intervalos de 0,5; 2, 4, 6 ou 12 h após a administração aguda de etanol (4,0 g/kg, i.p.) em camundongos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de 6-7 animais por grupo.

#### 4.7. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol

Os efeitos da administração de adenosina (agonista não-seletivo dos receptores de adenosina, 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.) no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol (4,0 g/kg, i.p.), em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado são ilustrados na Figura 13. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na

porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,24) = 16,73$ ;  $p < 0,0001$ ] e na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,24) = 92,63$ ;  $p < 0,001$ ], sem diferença significativa quanto ao número de entradas nos braços fechados [ $F(3,24) = 1,14$ ;  $p = 0,35$ ].

O teste subsequente de Newman-Keuls indicou que a adenosina, nas doses de 5,0 e 10,0 mg/kg (i.p.), produziu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, sem nenhuma alteração quanto ao número de entradas nos braços fechados, sugerindo que a ativação dos receptores de adenosina reverte o comportamento tipo-ansiosogênico observado durante a ressaca do etanol em camundongos (Figura 13).

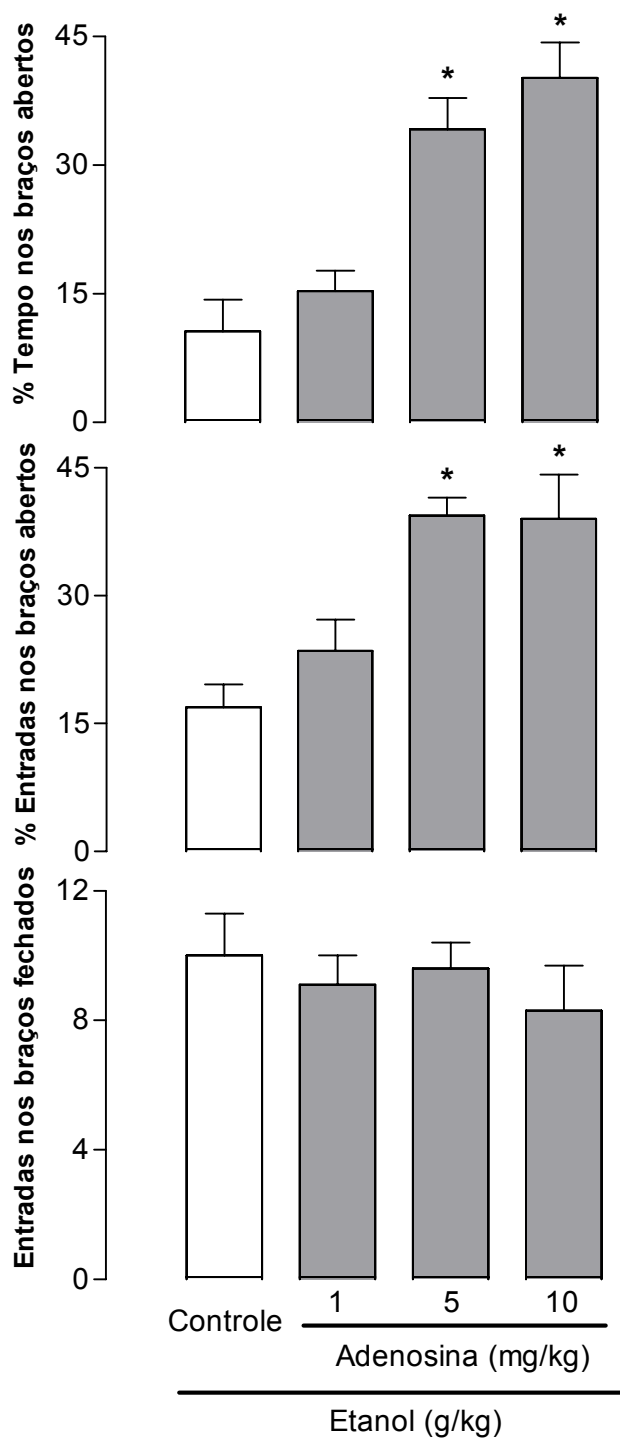


Figura 13. Efeito do tratamento com adenosina no comportamento tipo-ansio gênico induzido pela ressaca do etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com adenosina (1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) 18 h após o tratamento com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e 30 min antes de serem expostos ao labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo. \* $p < 0.05$  comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

A Figura 14 mostra os efeitos do tratamento com o agonista seletivo dos receptores A1 para adenosina CCPA (0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.) na ansiedade induzida pela ressaca do etanol (4,0 g/kg, i.p.) em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,24) = 13,46$ ;  $p < 0,0001$ ], na porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,24) = 13,05$ ;  $p < 0,0001$ ], e no número de entradas nos braços fechados [ $F(3,24) = 9,51$ ;  $p < 0,001$ ].

As comparações post-hoc (Newman-Keuls) indicaram que o CCPA, nas doses de 0,05 e 0,125 mg/kg (i.p.), produziu um aumento seletivo na exploração dos braços abertos do aparelho, sem nenhuma alteração quanto à frequência de entradas nos braços fechados. Além disso, as análises revelaram que a maior dose de CCPA (0,25 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente a atividade locomotora dos animais quando comparado com o grupo controle, verificado pela redução do número total de entradas nos braços fechados ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

Como pode ser visto na Figura 15, em contraste com os resultados obtidos com o tratamento com adenosina e CCPA, a administração do agonista seletivo dos receptores A2A para adenosina DPMA (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) não alterou significativamente os parâmetros comportamentais observados durante a ressaca do etanol nos animais expostos ao labirinto em cruz elevado: porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,24) = 0,86$ ;  $p = 0,47$ ], porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,24) = 0,11$ ;  $p = 0,95$ ] e número de entradas nos braços fechados [ $F(3,24) = 0,05$ ;  $p = 0,98$ ].

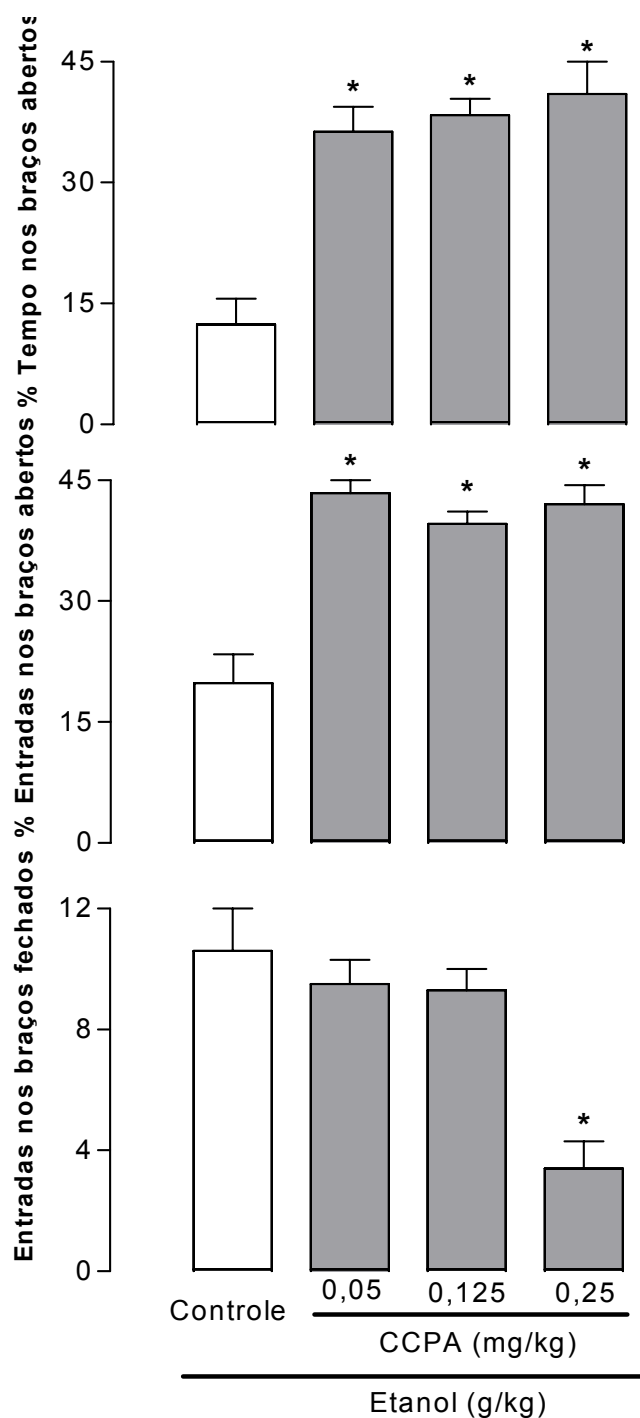


Figura 14. Efeito do tratamento com o agonista seletivo dos receptores de adenosina A1 CCPA no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com CCPA (0,05; 0,125 ou 0,25 mg/kg, i.p.) ou solução controle (veículo, i.p.) 18 h após o tratamento com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e 30 min antes de serem expostos ao labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

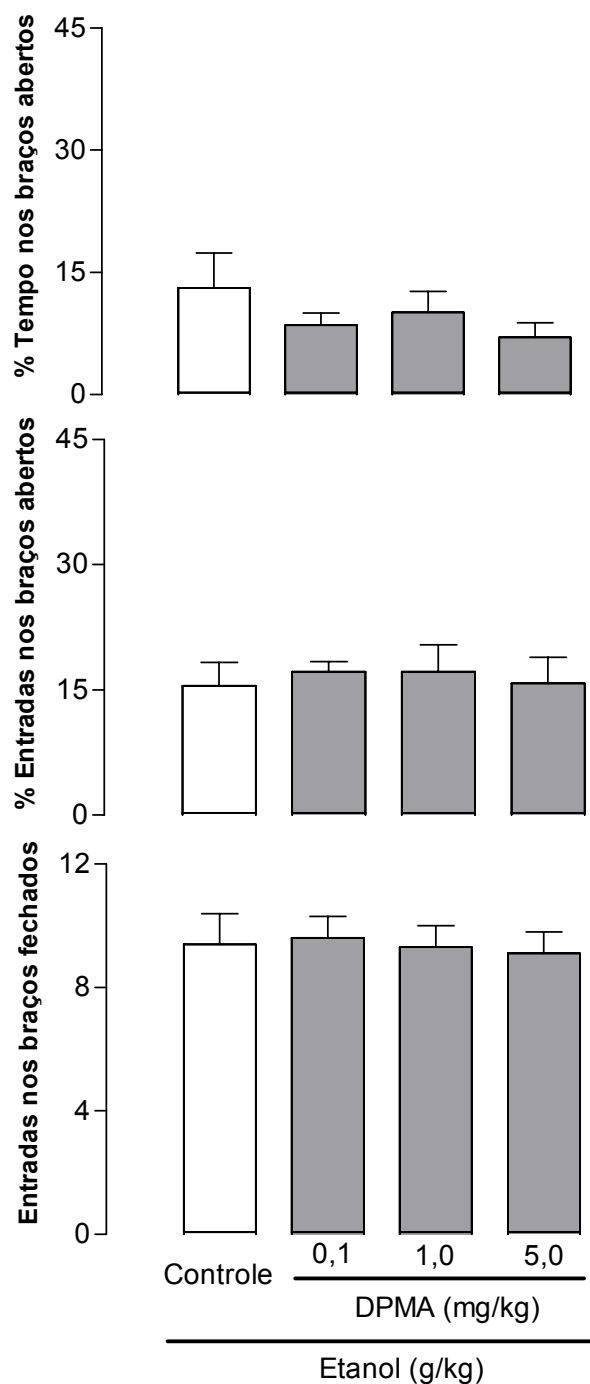


Figura 15. Efeito do tratamento com o agonista seletivo dos receptores de adenosina A<sub>2A</sub> DPMA no comportamento tipo-ansiolítico induzido pela ressaca do etanol em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Os animais foram tratados com DPMA (0,1; 1,0 ou 5,0 mg/kg, i.p.) ou solução controle (veículo, i.p.) 18 h após o tratamento com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e 30 min antes de serem expostos ao labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo.



Os efeitos da administração do antagonista seletivo dos receptores A1 DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.) 15 min antes do tratamento com CCPA (0,05 mg/kg, i.p.) na ansiedade induzida pela ressaca do etanol (4,0 g/kg, i.p.) em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado são ilustrados na Figura 16. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [ $F(3,21) = 21,74$ ;  $p < 0,0001$ ] e porcentagem de entradas nos braços abertos [ $F(3,21) = 40,12$ ;  $p < 0,0001$ ], sem diferença significativa para a frequência de entradas nos braços fechados [ $F(3,21) = 0,18$ ;  $p = 0,91$ ].

O teste subsequente de Newman-Keuls mostrou que a dose testada de DPCPX, quando administrada isoladamente, não alterou significativamente os parâmetros comportamentais avaliados no labirinto em cruz elevado. Entretanto, esta mesma dose de DPCPX foi capaz de reverter o efeito tipo-ansiolítico produzido pelo CCPA durante a ressaca do etanol ( $p < 0,05$ ), reforçando o efeito seletivo do CCPA sobre os receptores A1 para adenosina nos presentes resultados (Figura 16).

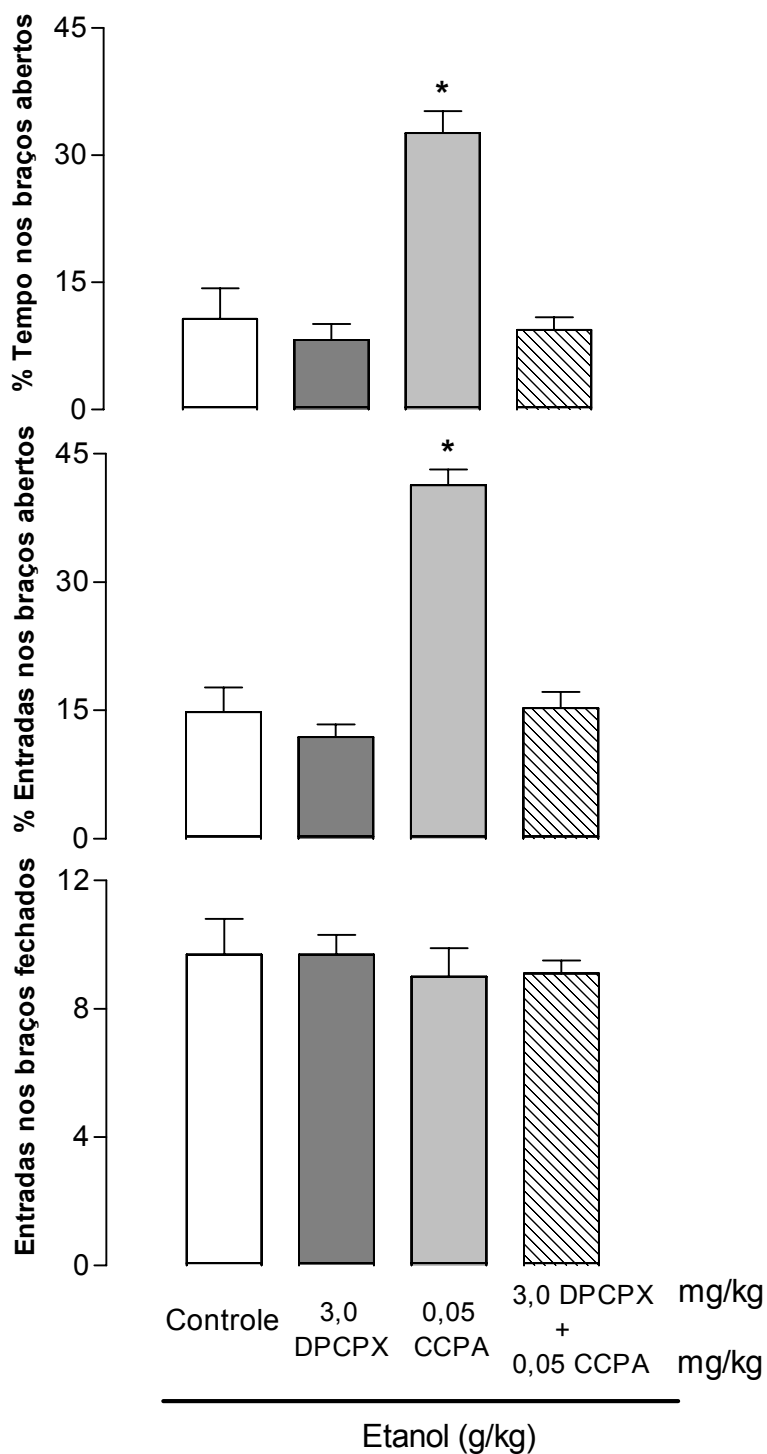


Figura 16. Efeito da administração do antagonista dos receptores A1 DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.), 15 min antes da injeção do CCPA (agonista do receptor A1, 0,05 mg/kg, i.p.) ou veículo (i.p.) em camundongos previamente (18 h antes) tratados com etanol (4,0 g/kg, i.p.), e testados 30 min depois no labirinto em cruz elevado. Os dados são representados como média ± E.P.M. de 6-7 animais por grupo. \*p<0.05 comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

*4.8. Desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol ao longo do tempo*

Os efeitos da administração de etanol (2,25 g/kg, i.p.) ou solução controle (i.p.) no desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora dos animais avaliados no rota-rod ao longo do tempo (20, 40 e 60 min) são ilustrados na Figura 17. A ANOVA de três vias (tratamento x tempo x dia) com medidas repetidas revelou um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,42) = 13,37$ ;  $p < 0,001$ ], para o fator tempo [ $F(2,42) = 14,57$ ;  $p < 0,0001$ ], para o fator dia [ $F(1,42) = 8,18$ ;  $p < 0,001$ ] e para a interação tratamento versus dia [ $F(1,42) = 69,40$ ;  $p < 0,0001$ ].

As comparações post-hoc (LSD) revelaram que a administração de etanol (2,25 g/kg, i.p.) induziu um significativo prejuízo motor aos 20 e 40 min, mas não aos 60 min, nos animais avaliados no rota-rod no dia 1 ( $p < 0,05$ ). No dia 2, este mesmo perfil comportamental foi observado no grupo controle desafiado com etanol (2,25 g/kg, i.p.). Entretanto, houve uma melhora tempo-dependente (mais evidente aos 20 min após o tratamento com etanol) do desempenho motor do grupo de animais tratados com etanol em ambos os dias, indicando um desenvolvimento consistente de tolerância rápida ao etanol (Figura 17).

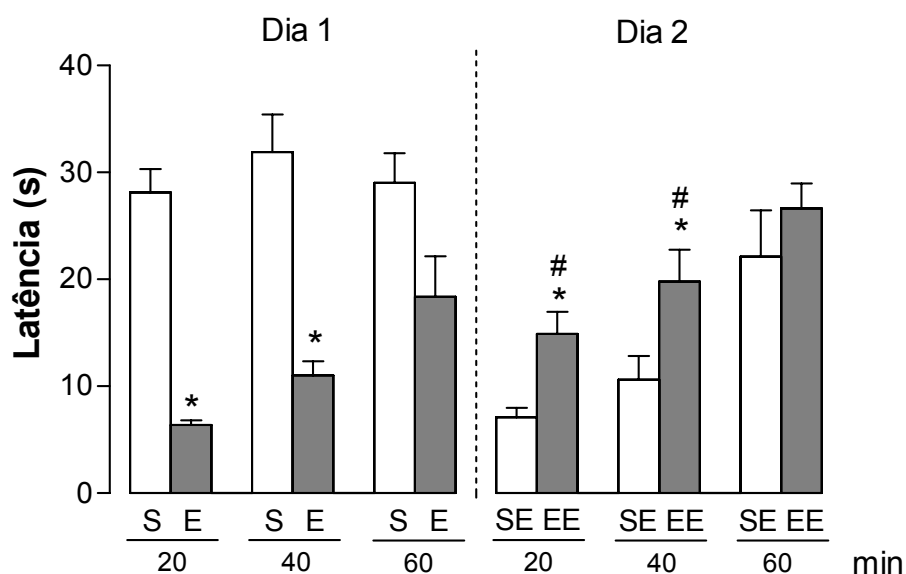
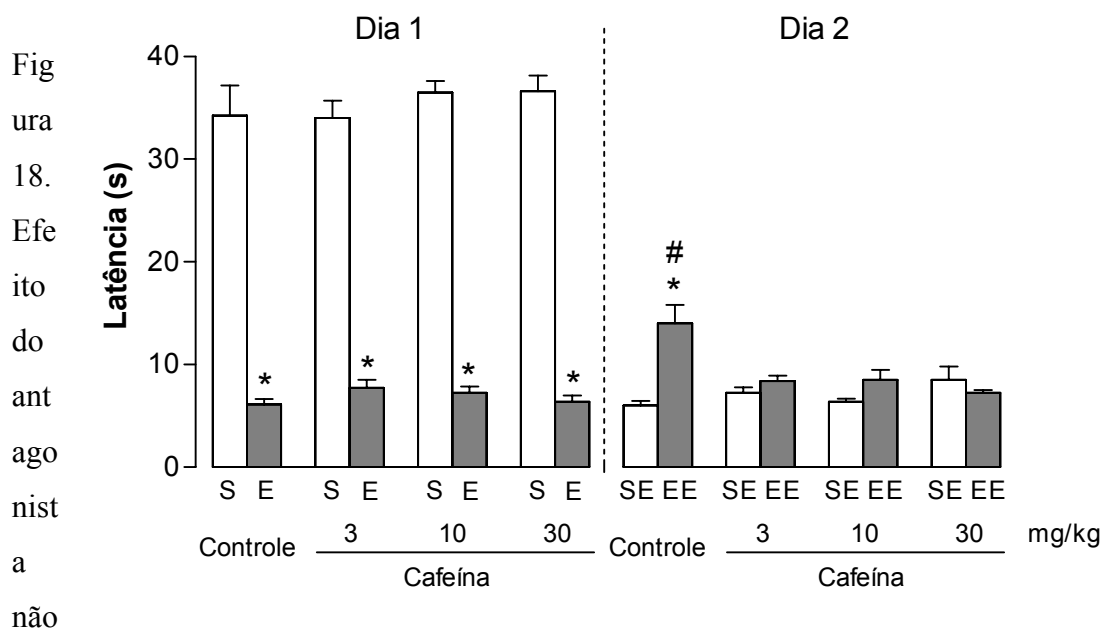


Figura 17. Desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol ao longo do tempo. No dia 1, os animais foram tratados intraperitonealmente com salina (S) ou etanol (E, 2,25 g/kg), e testados no rota-rod 20, 40 e 60 min após este tratamento. A tolerância rápida foi avaliada no dia 2, quando todos os animais receberam uma dose desafio de etanol (2,25 g/kg, i.p.), sendo novamente avaliados no rota-rod aos 20, 40 e 60 min. O grupo EE recebeu etanol em ambos os dias, enquanto o grupo SE recebeu salina no dia 1 e etanol no dia 2. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0.05$  comparado com o respectivo grupo controle do mesmo dia, # $p < 0,05$  comparado com o desempenho motor do mesmo grupo no dia 1 (teste LSD).

#### 4.9. Envolvimento dos receptores de adenosina A1 e A2A na tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol

Os efeitos da administração de cafeína (3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) em relação à tolerância rápida ao etanol podem ser visualizados na Figura 18. A ANOVA de três vias (pré-tratamento x tratamento x dia) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,56) = 394,45$ ;  $p < 0,0001$ ], para o fator dia [ $F(1,56) = 524,78$ ;  $p < 0,0001$ ] e para os fatores de interação entre o pré-tratamento x tratamento [ $F(3,56) = 3,26$ ;  $p < 0,01$ ] e pré-tratamento x tratamento x dia [ $F(3,56) = 2,89$ ;  $p < 0,05$ ].

Confirmando o experimento anterior, as comparações post-hoc indicaram o desenvolvimento de tolerância rápida avaliado no dia 2, no grupo tratado com etanol em ambos os dias (LSD,  $p < 0,05$ ). Além disso, o pré-tratamento com cafeína (3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) não alterou o desempenho motor dos animais tratados com salina (i.p.) ou etanol (2,25 g/kg, i.p.) no dia 1, sugerindo que o tratamento agudo com cafeína, nas doses testadas, não afeta a coordenação motora destes animais. Contudo, nenhum dos grupos tratados com a associação de cafeína e etanol no dia 1 apresentou uma melhora no desempenho motor quando avaliados no dia 2, sugerindo que todas as doses testadas de cafeína bloquearam o desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol (Figura 18).

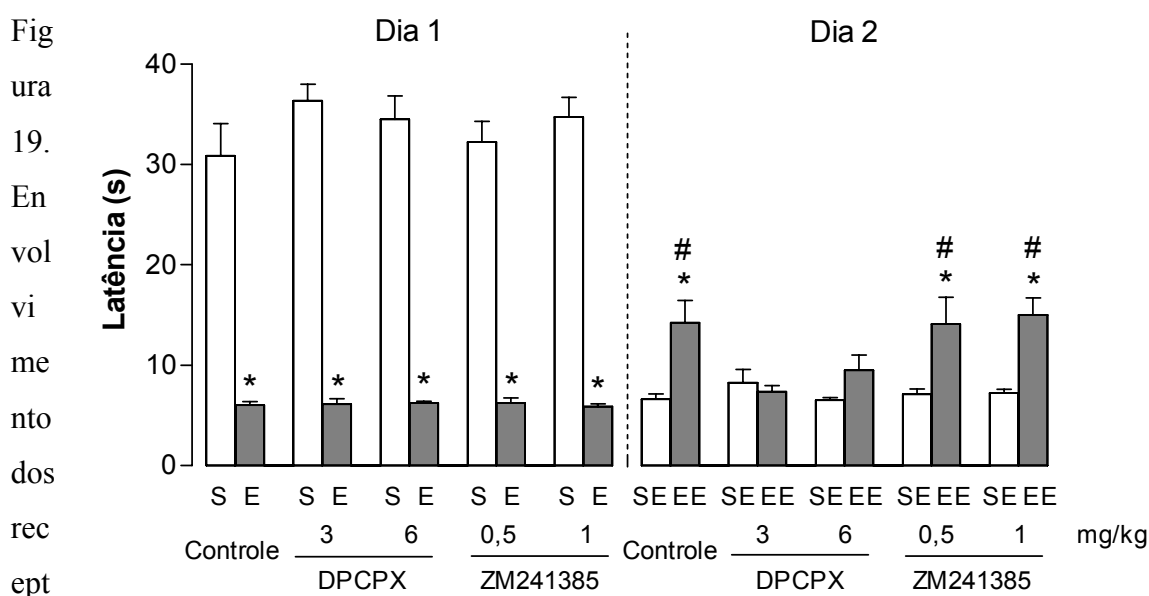


-seletivo dos receptores de adenosina cafeína no desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol em camundongos avaliados no rota-rod. No dia 1, quatro grupos foram tratados com salina (i.p.) ou cafeína (3,0; 10,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) 10 antes de receber salina (S) ou etanol (E, 2,25 g/kg, i.p.), e foram testados no rota-rod 20 min depois. A tolerância rápida foi avaliada no dia 2, quando todos os animais receberam uma dose desafio de etanol (2,25 g/kg, i.p.), e foram novamente testados no rota-rod 20 min depois. O grupo EE recebeu etanol em ambos os dias, enquanto o grupo SE recebeu salina no dia 1 e etanol no dia 2. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle do mesmo dia, # $p < 0,05$  comparado com o desempenho motor do mesmo grupo no dia 1 (teste LSD).

A Figura 19 ilustra os efeitos da administração dos antagonistas seletivos dos receptores de adenosina DPCPX (antagonista A1, 3,0 e 6,0 mg/kg, i.p.) e ZM241385 (antagonista A2A, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) no desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol. A ANOVA de três vias (pré-tratamento x tratamento x dia) revelou um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,70) = 250,0$ ;  $p < 0,0001$ ], para o fator dia [ $F(1,70) = 247,56$ ;  $p < 0,0001$ ] e para a interação pré-tratamento vs. tratamento [ $F(4,70) = 2,98$ ;  $p < 0,02$ ].

As análises subseqüentes indicaram que o pré-tratamento com DPCPX (3,0 e 6,0 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) não atenuaram a perda da coordenação motora induzida

pelo etanol (2,25 g/kg, i.p.) nos animais avaliados no rota-rod no dia 1. Contudo, o pré-tratamento com DPCPX (3,0 e 6,0 mg/kg, i.p.), mas não com ZM241385 (0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.), 10 min antes da injeção de etanol (2,25 g/kg, i.p.) no dia 1, inibiu a melhora do desempenho motor avaliado no dia 2 (LSD,  $p < 0.05$ ), sugerindo que o bloqueio dos receptores A1 para adenosina impede o desenvolvimento de tolerância rápida ao etanol (Figura 19).



ores de adenosina A1 e A2A no desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora induzida pelo etanol em camundongos avaliados no rota-rod. No dia 1, cinco grupos foram tratados com salina (i.p.) ou DPCPX (antagonista do receptor A1, 3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (antagonista do receptor A2A, 0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) 10 antes de receber salina (S) ou etanol (E, 2,25 g/kg, i.p.), e testados no rota-rod 20 min depois. A tolerância rápida foi avaliada no dia 2, quando todos os animais receberam uma dose desafio de etanol (2,25 g/kg, i.p.), e foram novamente testados no rota-rod 20 min depois. O grupo EE recebeu etanol em ambos os dias, enquanto o grupo SE recebeu salina no dia 1 e etanol no dia 2. Os resultados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle do mesmo dia, # $p < 0,05$  comparado com o desempenho motor do mesmo grupo no dia 1 (teste LSD).

#### 4.10. Aquisição da preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol

A Figura 20 ilustra a média  $\pm$  E.P.M. da diferença do tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com etanol (0,5; 1,0 ou 2,0 g/kg, i.p.) durante o pós-teste (pós-

condicionamento) versus o pré-teste (pré-condicionamento). A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento no tempo gasto no compartimento pareado com etanol [F(3,28) = 4,07; p<0,02]. As comparações subseqüentes indicaram que o etanol induziu uma significativa preferência condicionada de lugar na dose de 2,0 g/kg (i.p.) quando comparado com o grupo controle (p<0,01), indicando a propriedade de reforço positivo do etanol nesta dose.

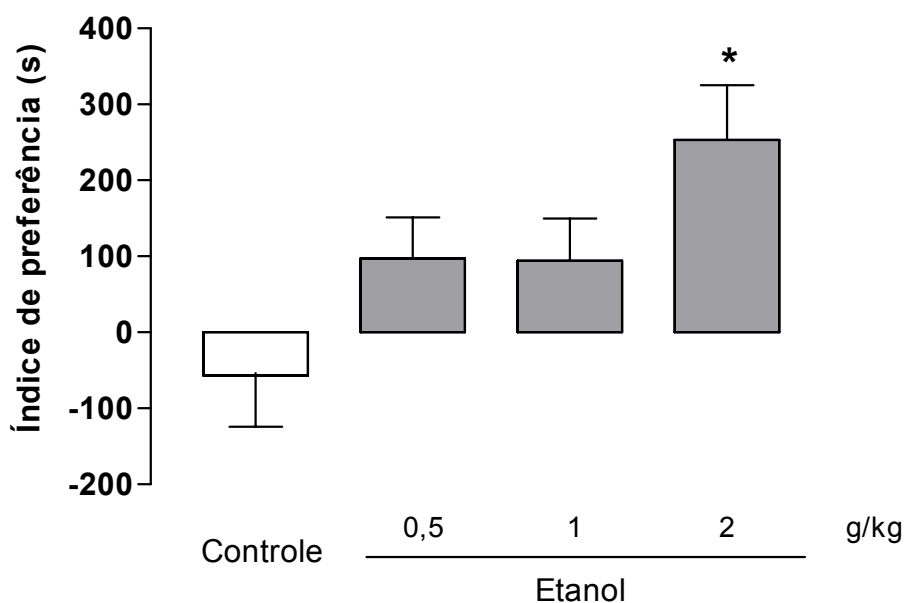


Figura 20. Aquisição da preferência condicionada de lugar quanto ao tempo de permanência no compartimento pareado com etanol (0,5; 1,0 ou 2,0 g/kg, i.p.) ou salina em camundongos. O índice de preferência representa a diferença do tempo gasto no compartimento pareado depois (teste) e antes (basal) do condicionamento com etanol. Os resultados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \*p<0,05 comparado com o grupo controle (teste de Newman-Keuls).

*4.11. Efeito da cafeína nas fases de aquisição e expressão da preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol em camundongos*



O efeito da administração de cafeína na aquisição da preferência condicionada de lugar ao etanol pode ser visto na Figura 21. A ANOVA de duas vias, sendo as variáveis independentes o pré-tratamento (salina ou cafeína 10,0, 20,0 e 30,0 mg/kg) e tratamento (salina ou etanol 2,0 g/kg), e a variável dependente o tempo de permanência (s) dos animais condicionados no compartimento pareado com etanol 2,0 g/kg, mostrou somente um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,68) = 31,9$ ;  $p < 0,0001$ ], replicando que a administração de etanol (2,0 g/kg, i.p.), durante as sessões de condicionamento, produz preferência condicionada de lugar.

Mais importante, o pré-tratamento com as maiores doses de cafeína (20,0 e 30,0 mg/kg) tendeu em atenuar a preferência de lugar induzida pelo etanol (2,0 g/kg) ( $p = 0,09$  e  $p = 0,1$ , respectivamente). Além disso, a administração per se de cafeína (10,0; 20,0 ou 30,0 mg/kg), não alterou a preferência dos animais pelo compartimento pareado, indicando que a cafeína, ao menos nas doses testadas e neste protocolo experimental, não apresenta propriedades reforçadoras (Figura 21).

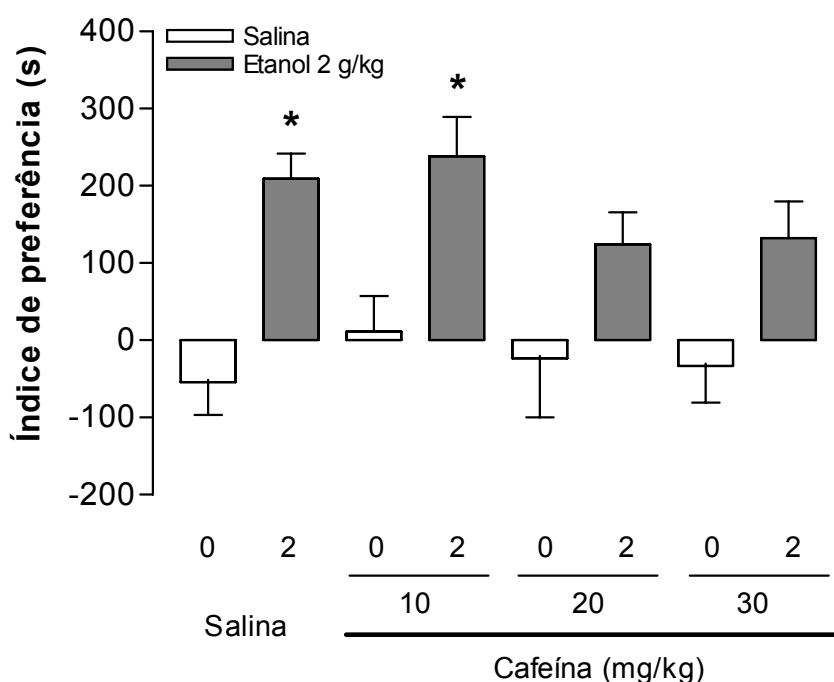


Figura 21. Efeito da cafeína (10,0; 20,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) na aquisição da preferência condicionada de lugar ao etanol (2,0 g/kg, i.p.) em camundongos. O índice de preferência representa a diferença do tempo gasto no compartimento pareado depois (teste) e antes (basal) do condicionamento com etanol. Os resultados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8-12 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle (teste de Newman-Keuls).

A Figura 22 ilustra o efeito da administração de cafeína na expressão da preferência condicionada de lugar ao etanol. A ANOVA de duas vias revelou somente um efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,52) = 44,25$ ;  $p < 0,0001$ ], indicando preferência condicionada de lugar induzida pelo etanol (2,0 g/kg, i.p.). No entanto, as comparações subsequentes demonstraram que a cafeína (10,0 e 20,0 mg/kg, i.p.) não alterou o tempo de permanência dos animais no compartimento pareado com etanol, sugerindo, ao menos em parte, que a cafeína não participa da expressão da preferência de lugar ao etanol.

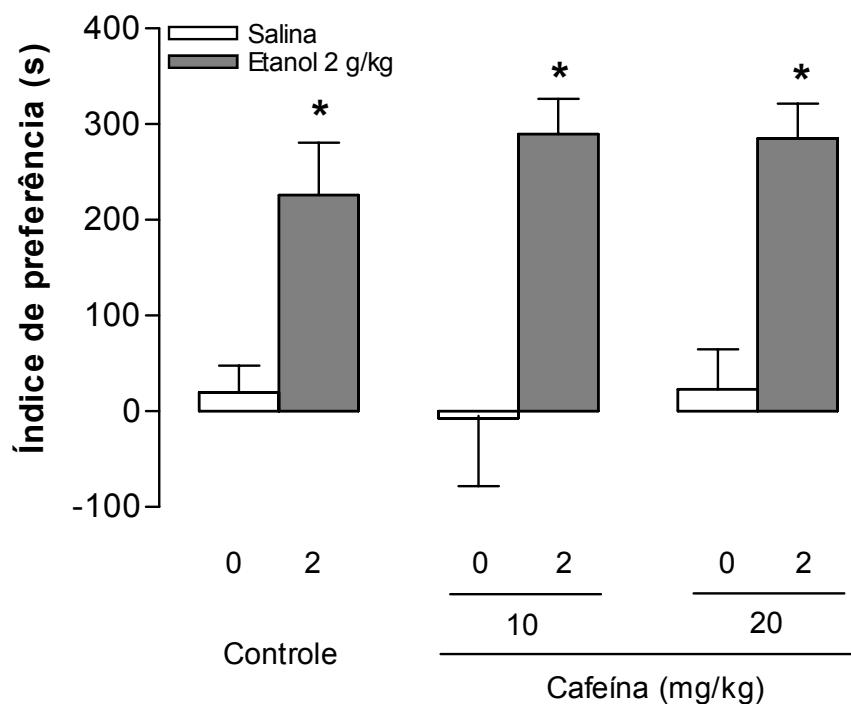


Figura 22. Efeito da cafeína (10,0 ou 20,0 mg/kg, i.p.) na expressão da preferência condicionada de lugar ao etanol (2,0 g/kg, i.p.) em camundongos. O índice de preferência representa a diferença do tempo gasto no compartimento pareado depois (teste) e antes (basal) do condicionamento com etanol. Os resultados são representados como média  $\pm$  E.P.M. de 8-11 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparado com o respectivo grupo controle (teste de Newman-Keuls).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram pela primeira vez, que os receptores de adenosina, principalmente os receptores A1, modulam as repostas tipo-ansiolíticas induzidas pela administração aguda de etanol (1,2 g/kg, i.p.), assim como o efeito tipo-ansio gênico (ressaca) verificado 18 h após o tratamento sistêmico com uma dose elevada de etanol (4,0 g/kg). Os presentes resultados evidenciam ainda, que o bloqueio dos receptores A1 para adenosina, mas não dos receptores A2A, modula importantes neuroadaptações funcionais observadas durante a exposição repetida ao etanol, como o desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora. Além disso, estes resultados também demonstram que o bloqueio não-seletivo dos receptores de adenosina, mediado pela cafeína, não altera o reforço positivo induzido pelo etanol.

Como mencionado na Introdução, um número crescente de evidências tem apontado para uma participação do neuromodulador adenosina como um importante mediador de várias respostas comportamentais, moleculares e celulares promovidas pelo etanol, tanto em humanos quanto em roedores. A exposição aguda ao etanol aumenta a concentração extracelular de adenosina (Nagy et al., 1990; Krauss et al., 1993). Dois principais mecanismos têm sido propostos para explicar este aumento nos níveis basais de adenosina e, posteriormente, a ativação dos seus receptores após a administração de etanol.

O primeiro envolve o metabolismo do etanol pelo fígado, que aumenta os níveis plasmáticos de acetato, que pode atravessar a barreira hemato-encefálica e ser metabolizado formando adenosina no SNC (Carmichael et al., 1991; Kiselevski et al., 2003). O segundo, envolve o bloqueio seletivo, mediado diretamente pelo etanol, do transportador responsável pelo transporte passivo de adenosina (equilibrative nucleotide transporter type 1, ENT1), inibindo desta maneira a recaptação neuronal de adenosina (Nagy et al., 1990; Krauss et al., 1993; Choi et al., 2004).

Grande parte dos estudos realizados até o presente momento tem confirmado a crença popular de que a cafeína, um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, pode bloquear os efeitos intoxicantes do etanol como, por exemplo, sedação e perda da coordenação motora, induzidas por doses moderadas e altas de etanol em humanos (Franks et al., 1975; Burns e Moskowitz, 1990; Fillmore e Vogel-Sprott, 1995; Liguori e Robinson, 2001; Drake et al., 2003).

Em animais de laboratório, estudos têm demonstrado que a cafeína, bem como antagonistas seletivos dos receptores de adenosina, pode reduzir a perda do reflexo postural (El Yacoubi et al., 2003), além de inibir a perda da coordenação motora promovida pelo etanol (Dar et al., 1983; Clark e Dar, 1988; Dar, 1990; Meng e Dar, 1994; Barwick e Dar, 1998; Dar, 2001). Contudo, até o presente momento nenhum estudo havia investigado a participação deste sistema nas propriedades ansiolíticas do etanol.

Os resultados do presente estudo demonstram que o efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol (1,2 g/kg, i.p.) em camundongos é modulado, ao menos em parte, pela ativação dos receptores de adenosina A1, uma vez que esta resposta é bloqueada pela administração prévia de doses “não-ansiolíticas” dos antagonistas, cafeína (antagonista não-seletivo, 10,0 mg/kg, i.p.) e DPCPX (antagonista seletivo dos receptores A1, 3,0 mg/kg, i.p.), mas não por ZM241385 (antagonista seletivo dos receptores A2A, 1,0 mg/kg, i.p.).

Este efeito não se deve a alterações motoras específicas, uma vez que, o número de entradas nos braços fechados, parâmetro utilizado como medida indireta de atividade motora, não diferiu dos demais grupos avaliados. Os presentes dados indicam ainda um aumento de respostas tipo-ansiolíticas verificadas após a administração de doses “não-ansiolíticas” de CCPA (0,125 mg/kg, i.p.) e etanol (0,6 mg/kg, i.p.), sugerindo um efeito sinérgico entre a ativação dos receptores A1 e o etanol.

Além disso, os presentes resultados confirmam e estendem o envolvimento dos receptores de adenosina em modelos experimentais de ansiedade e emocionalidade, uma vez que mostram a

existência de respostas tipo-ansiolíticas induzidas pelos antagonistas destes receptores, cafeína (30,0 mg/kg, i.p.) e DPCPX (6,0 mg/kg, i.p.), em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado, enquanto o agonista dos receptores de adenosina A1 CCPA (0,25 mg/kg, i.p.) apresenta um perfil tipo-ansiolítico neste paradigma.

Corroborando com estudos anteriores, que tem demonstrado as propriedades “ansiolíticas” da cafeína em diferentes modelos animais de ansiedade, como por exemplo, no teste de interação social (Baldwin et al., 1989; Bhattacharya et al., 1997), no labirinto em cruz elevado (Pellow et al., 1985; Baldwin et al., 1989; El Yacoubi et al., 2000) e no teste da caixa claro-escuro (Imaizumi et al., 1994; El Yacoubi et al., 2000), foi verificado que a maior dose de cafeína testada (30,0 mg/kg, i.p.) reduziu a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado. Entretanto, estas propriedades ansiolíticas não foram observadas com a menor dose de cafeína (10,0 mg/kg, i.p.).

De maneira semelhante ao verificado com a cafeína, a administração per se de DPCPX, antagonista seletivo dos receptores A1, na maior dose testada (6,0 mg/kg, i.p.) exerce um efeito tipo-ansiolítico nos animais avaliados no labirinto em cruz elevado. Este resultado contrasta com estudos anteriores, que não verificaram comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado após o tratamento com DPCPX (Jain et al., 1995; El Yacoubi et al., 2000). Contudo, nestes estudos a faixa de doses utilizadas de DPCPX (0,05-5,0 mg/kg) pode explicar a discrepância com os presentes resultados, uma vez que no presente estudo também não foi detectado nenhuma atividade tipo-ansiolítica do DPCPX na menor dose testada (3,0 mg/kg, i.p.).

Por outro lado, uma série de estudos tem demonstrado que camundongos nocautes (KO) do receptor de adenosina A1 apresentam elevados níveis de ansiedade (Johansson et al, 2001; Gimenez-Llort et al, 2002; Lang et al, 2003). Além disso, confirmando o estudo de Florio e colaboradores (1998), os presentes resultados indicam um efeito tipo-ansiolítico do CCPA (0,25 mg/kg, i.p.), um potente agonista seletivo dos receptores A1.

Como previamente demonstrado por El Yacoubi e colaboradores (2000), a administração do antagonista seletivo dos receptores A2A ZM241385 (1,0 ou 3,0 mg/kg, i.p.) não afetou nenhum dos parâmetros comportamentais que foram registrados no labirinto em cruz elevado, indicando uma ausência de efeito do ZM241385, ao menos nas doses testadas, neste modelo de ansiedade. Em conjunto, estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Jain et al., 1995; Florio et al., 1998; Johansson et al., 2001; Giménez-Llort et al., 2002; Lang et al., 2003) que tem demonstrado o envolvimento dos receptores para adenosina (principalmente receptores A1) na modulação de respostas relacionadas à ansiedade em camundongos.

O resultado mais relevante desta etapa do nosso estudo foi que a administração aguda de doses “não-ansiógênicas” dos antagonistas dos receptores de adenosina, cafeína (10,0 mg/kg, i.p.) e DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.), mas não o ZM241385 (1,0 mg/kg, i.p.), bloqueou as ações tipo-ansiolíticas do etanol (1,2 g/kg, i.p.) no labirinto em cruz elevado, sugerindo uma interação funcional entre o sistema adenosinérgico e o etanol em comportamentos relacionados à ansiedade. Corroborando com nossa hipótese, os presentes resultados mostram uma resposta sinérgica induzida por doses “não-ansiolíticas” do agonista do receptor A1 CCPA (0,125 mg/kg, i.p.) e o etanol (0,6 g/kg, i.p.), visto que produziram um marcante aumento na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos de camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado.

O fato dos receptores de adenosina A1 modular as propriedades tipo-ansiolíticas do etanol sugerem, como hipótese especulativa, que agonistas seletivos dos receptores A1 podem representar uma importante ferramenta terapêutica para prevenir os efeitos ansiógênicos gerados pela abstinência ao etanol, reduzindo a recaída em pacientes alcoólicos.

Para nosso conhecimento, somente um estudo havia testado o potencial desta hipótese no tratamento da ansiedade induzida pela abstinência ao etanol. Gatch e colaboradores (1999) investigaram o efeito do agonista e do antagonista seletivo dos receptores A1, R-PIA e CPT, respectivamente, na abstinência induzida pela exposição crônica (7 dias) ao etanol em ratos. Os

autores encontraram efeitos opostos ao esperado, com uma redução do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em animais tratados com R-PIA, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico, enquanto o antagonista para os receptores A1, o CPT, mostrou um efeito ansiolítico durante a abstinência ao etanol.

A explicação proposta pelos autores para a inexistência da propriedade tipo-ansiolítica do agonista do receptor A1 é que o número de receptores para adenosina está marcadamente reduzido durante a abstinência ao etanol (Dar et al., 1983) e, portanto, poderia não haver receptores suficientes para produzir um efeito, até mesmo quando todos os receptores estivessem completamente ocupados. Entretanto, os autores não descartaram a importância de investigações adicionais para avaliar os efeitos de agentes adenosinérgicos durante a abstinência ao etanol (Gath et al., 1999).

Neste sentido, outro objetivo proposto no presente trabalho foi investigar o potencial de agonistas do receptor A1 e A2A em reduzir a ansiedade experimental verificada durante a abstinência aguda (ressaca) ao etanol (4,0 g/kg, i.p.) em camundongos testados no labirinto em cruz elevado. Os presentes resultados mostram um desenvolvimento tempo-dependente de comportamentos tipo-ansiolíticos verificados após a administração aguda de etanol (4,0 g/kg, i.p.), indicado pela significativa redução na exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

Esta “ansiedade” induzida pela abstinência aguda ao etanol foi mais pronunciada 18 h após a administração de etanol, um intervalo de tempo em que o etanol foi completamente depurado do organismo. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que têm demonstrado um aumento no comportamento tipo-ansiolítico durante a ressaca do etanol em ratos adultos avaliados em testes de vocalização ultrassônica (Brasser e Spear, 2002), no labirinto em cruz elevado (Doremus et al, 2003) e no teste de interação social (Varlinskaya e Spear, 2004). Mais importante, nossos resultados mostram pela primeira vez que a ativação de receptores A1, mas não de



receptores A2A, reduz o comportamento tipo-ansiosgênico observado durante a abstinência aguda ao etanol em camundongos.

No presente estudo, a administração aguda de doses “não-ansiolíticas” de adenosina (5,0 e 10,0 mg/kg, i.p.) ou do agonista seletivo dos receptores A1 CCPA (0,05 e 0,125 mg/kg, i.p.), mas não do agonista seletivo dos receptores A2A DPMA (0,1-5,0 mg/kg, i.p.), diminuiu o comportamento tipo-ansiosgênico durante a ressaca do etanol em camundongos, verificado pelo aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Esta resposta parece ser especificamente dependente da ativação dos receptores A1, pois o efeito do CCPA (0,05 mg/kg, i.p.) no comportamento tipo-ansiosgênico induzido pela ressaca do etanol, foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista seletivo dos receptores A1 DPCPX (3,0 mg/kg, i.p.).

Além disso, os efeitos da administração dos agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina, empregados no presente estudo, sobre comportamentos relacionados à ansiedade e emocionalidade avaliada no labirinto em cruz elevado, parecem não estar, ao menos nas doses testadas, associados a um comprometimento da função motora dos camundongos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas quanto ao número total de entradas nos braços fechados do labirinto. Além disso, os parâmetros comportamentais avaliados no campo aberto, número de cruzamentos e atos de levantar, medidas diretas da atividade locomotora, também não apresentaram alterações significativas.

Os sinais negativos verificados durante a abstinência ao etanol, como por exemplo, náuseas, tremores, taquicardia, irritabilidade e ansiedade, são frequentemente verificados nos períodos iniciais após a exposição, geralmente, prolongada do consumo de etanol, tanto em humanos, como em roedores (para revisão ver Finn e Crabbe, 1997; Kliethermes, 2005), e representam um importante fator motivacional para a recaída ao consumo de etanol (Cloninger, 1987). Muitos estudos têm consistentemente demonstrado um aumento no comportamento tipo-ansiosgênico

durante o período de abstinência após a exposição crônica ao etanol em roedores (File et al, 1991, 1993; Lal et al, 1991; Knapp et al, 1993; Gatch et al, 1999; Gatch e Lal, 2001).

Os presentes resultados replicam e estendem estudos anteriores (Concas et al, 1994; Kaplan et al, 1999) que têm investigado o potencial de agonistas do receptor A1 em reduzir os sinais de abstinência após a exposição crônica de etanol. Concas e colaboradores (1994) demonstraram que o CCPA inibe os sintomas de abstinência, como tremores e convulsões, em ratos tratados repetidamente com etanol (12,0 – 18,0 g/kg diariamente por 6 dias), um efeito bloqueado pelo DPCPX. Resultados semelhantes foram relatados por Kaplan e colaboradores (1999) em camundongos que receberam uma dieta líquida de etanol durante 14 dias, e tratados com o agonista do receptor A1 R-PIA durante o período de abstinência ao etanol.

Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e as regiões anatômicas envolvidas na modulação dos receptores de adenosina sobre as respostas comportamentais observadas durante a ressaca do etanol. Em função dos nossos resultados, uma hipótese especulativa pode ser sugerida. Muitos estudos têm demonstrado que agonistas dos receptores A1 podem inibir a liberação neural do glutamato (Dolphin e Prestwich, 1985; Fredholm et al, 1989) e da acetilcolina (Jin et al, 1993; Ribeiro et al, 1996), dois neurotransmissores excitatórios que apresentam um importante papel na síndrome de abstinência ao etanol (Rossetti e Carboni, 1995; Imperato et al, 1998).

Desta maneira, este mecanismo pode, ao menos em parte, explicar a presente eficácia da adenosina e CCPA, agonistas dos receptores de adenosina, em reduzir o comportamento tipo-ansiossênico induzido pelo ressaca do etanol.

Adicionalmente, estudos experimentais de união/ligação específica (binding) têm demonstrado o envolvimento dos receptores A1 na modulação dos efeitos da abstinência ao etanol. A abstinência após a exposição crônica de etanol produz um aumento na densidade dos receptores A1 em regiões cerebelares (Concas et al, 1996) e no córtex cerebral (Daly et al, 1994) de roedores.

No mesmo sentido, Jarvis e Becker (1998) demonstraram que, após a exposição crônica ao vapor de etanol, como também, após simples e/ou repetidos episódios de abstinência, ocorre um aumento na densidade dos receptores A1 em regiões corticais, sem, no entanto, produzir alterações significativas nos receptores A2A para adenosina no estriado. Juntos, estes resultados indicam que a expressão aumentada dos receptores A1 para adenosina, um receptor usualmente acoplado a proteína G inibitória (Gi e Go), parece ter uma importante participação nas alterações adaptativas observadas durante a abstinência ao etanol.

Além disso, é importante enfatizar que o sistema adenosinérgico parece estar envolvido não somente na expressão de sinais de abstinência ao etanol, como também de outras drogas de abuso, como opióides e cocaína. Por exemplo, muitos estudos mostram que agonistas dos receptores A1 e A2A atenuam, enquanto antagonistas destes receptores potencializam, os sinais de abstinência induzidos pela morfina em camundongos (Kaplan e Sears, 1996; Zarrindast et al, 1999) e em ratos (Salem e Hope, 1997).

De acordo com estas considerações, parece que o neuromodulador adenosina é crucial durante os períodos de abstinência para as diferentes drogas de abuso, uma vez que a ativação de seus receptores produz um “tonus” inibitório (reduzindo os sinais específicos de abstinência associados à cada droga), que quando bloqueados, resulta em aumento de comportamentos característicos de abstinência.

Como já relatado na Introdução, além dos sinais característicos observados na abstinência ao etanol, a sua ingestão excessiva e prolongada leva a importantes alterações neuroadaptativas em diversos sistemas neuronais associados com o desenvolvimento de tolerância e sensibilização, além de alterações residuais que expressam a vulnerabilidade à recaída (Koob, 2003). Estudos realizados com indivíduos que apresentam histórico familiar de alcoolismo sugerem que existe uma associação entre a baixa resposta (ou sensibilidade) para os efeitos do etanol e o risco para o desenvolvimento do alcoolismo (Schuckit, 1994).

A exposição repetida resulta, freqüentemente, na diminuição da resposta para os efeitos do etanol no SNC. Esta adaptação, referida como tolerância, é influenciada por fatores genéticos e ambientais. A tolerância tem ocupado um lugar proeminente na pesquisa do alcoolismo, visto que o seu desenvolvimento tem sido reconhecido como uma importante característica da dependência, e é ainda listado como um dos critérios de diagnóstico pelo DSM-IV RT (American Psychiatric Association – APA, DSM-IV RT, 2000), bem como representa um importante indicador da suscetibilidade ao alcoolismo (Schuckit, 1986).

Devido às dificuldades inerentes no estudo com humanos, tem-se desenvolvido numerosos paradigmas para o estudo da tolerância em modelos animais, geralmente testes de coordenação motora, sedação e hipotermia (Crabbe et al., 1994). Com estes modelos, ao menos três formas de tolerância tem sido definidas operacionalmente, tolerância aguda, rápida e crônica (Kalant et al., 1971), e são em grande parte dependentes da quantidade e maneiras de exposição ao etanol, além do modelo experimental utilizado para mensurar a tolerância (Le, 1990; Khanna et al., 1993).

Dentre estes, o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol têm sido frequentemente observado em resposta a uma segunda dose administrada 8-24 h após a primeira exposição ao etanol (Crabbe et al. 1979; Khanna et al. 1993, 1996; Barbosa e Morato 2001; Da Silva et al., 2001; Wazlawik e Morato 2003; Varaschin et al., 2005).

Como relatado anteriormente, muitas evidências têm sugerido que os receptores de adenosina A1, localizados em regiões encefálicas essenciais para o controle motor como, por exemplo, estriado, cerebelo e córtex motor, são alvos primários na modulação da perda da coordenação motora induzida pelo etanol (Dar et al., 1983; Clark e Dar, 1988; Dar, 1990; Meng e Dar, 1994, 1995; Barwick e Dar, 1998; Dar, 2001). A ativação dos receptores A1 para adenosina potencializa a perda da coordenação induzida pelo etanol, enquanto o bloqueio destes receptores diminui esta resposta (Mailliard e Diamond, 2004).

Contudo, poucos estudos têm caracterizado o envolvimento deste sistema nos mecanismos de tolerância à perda da coordenação motora ao etanol. Desta forma, investigamos a participação dos receptores A1 e A2A no desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol em camundongos avaliados no rota-rod.

Os presentes resultados sugerem que os receptores de adenosina (principalmente os receptores A1) modulam esta importante resposta neuroadaptativa, uma vez que a administração intraperitoneal (i.p.) aguda de cafeína (3,0, 10,0 ou 30,0 mg/kg) ou do antagonista seletivo dos receptores A1 DPCPX (3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.) 10 min antes da injeção de etanol (2,25 g/kg, i.p.) no dia 1, bloqueou o desenvolvimento da tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol avaliada no dia 2. No entanto, a administração do antagonista seletivo dos receptores A2A ZM241385 (0,5 ou 1,0 mg/kg, i.p.) não foi efetivo em bloquear esta resposta.

A exposição crônica ao etanol induz alterações neuroadaptativas que resultam tanto na redução da expressão do transportador (ENT1) responsável pela recaptação de adenosina, quanto da inibição do ENT1 mediada pelo etanol, sugerindo um mecanismo de down-regulation compensatório no sistema de adenosina após a exposição repetida de etanol (Nagy et al., 1990). De acordo com esta hipótese, estudos têm demonstrado que o bloqueio do “tônus” inibitório mediado pela adenosina, produz animais menos sensíveis aos efeitos agudos do etanol e com elevado consumo voluntário de etanol (Naassila et al., 2002; Choi et al., 2004). Além disso, estas alterações estão associadas com uma redução da atividade dos receptores de adenosina A1 no núcleo accumbens (Choi et al., 2004).

Entretanto, Kiselevski e colaboradores (2003) demonstraram recentemente que o tratamento crônico (7 dias) com etanol (3,5 g/kg, i.p.) aumentou a concentração extracelular de adenosina no córtex cerebral, sem alterações em outras regiões encefálicas, como o hipotálamo e estriado de ratos.

Por outro lado, é importante mencionar que, ao contrário do observado em trabalhos anteriores (Dar, 1990; Meng e Dar, 1994, 1995; Barwick e Dar, 1998; Dar, 2001), os antagonistas de adenosina empregados no presente estudo, não alteraram a perda da coordenação motora observada após a administração de etanol no dia 1 e, tampouco, o desempenho motor de camundongos tratados com salina no teste do rota-rod. Estes resultados devem-se, provavelmente, às diferenças no protocolo experimental (como por exemplo, a velocidade de rotação do rota-rod e o tempo de exposição dos animais no modelo) utilizado no presente estudo.

Além disso, nossos resultados contrastam com as descrições prévias feitas por Fillmore (2003), em que a administração combinada de etanol e cafeína aumentou a tolerância ao prejuízo do desempenho psicomotor induzido pelo etanol. Provavelmente, esta diferença se deve a mudanças relativas ao protocolo experimental, como por exemplo, forma de administração, dose utilizada, fatores contextuais, e histórico do uso de outras substâncias psicoativas.

Nossos resultados reforçam trabalhos prévios da literatura (Barbosa e Morato, 2001; Da Silva e Takahashi, 2001), mostrando que a administração de etanol, na dose de 2,25 g/kg (i.p.), promove um acentuado prejuízo no desempenho motor de camundongos avaliados no teste do rota-rod, com recuperação gradual ao longo do tempo. Além disso, comprova o desenvolvimento da tolerância rápida para a perda da coordenação motora induzida pela repetida administração de etanol (2,25 g/kg, i.p.) em um curto intervalo de tempo (24 h), visto que foi estatisticamente significante somente aos 20 e 40 min após a administração repetida de etanol (2,25 g/kg, i.p.) no dia 2, sugerindo que este fenômeno é tempo-dependente, e que fatores farmacocinéticos não são inteiramente responsáveis por este evento.

Muitos estudos têm mostrado que a tolerância rápida parece envolver principalmente mecanismos funcionais (relacionados com a farmacodinâmica), do que disposicionais (relacionados com eventos farmacocinéticos), desde que as concentrações sanguíneas de etanol tanto do grupo

experimental, quanto do grupo controle, no segundo dia do experimento (dose desafio de etanol) sejam semelhantes (Khanna et al., 1994).

Confirmando esta hipótese, estudos anteriores (Khanna et al., 1994; Barbosa e Morato 2001; Zaleski et al. 2001) têm demonstrado que a administração de drogas que foram eficazes em prevenir o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol em camundongos, não alterou os níveis plasmáticos de etanol no dia 2. Neste sentido, a cafeína e o DPCPX parecem influenciar especificamente o desenvolvimento da tolerância rápida ao etanol, sem causar outros efeitos per se que podem interferir com a interpretação destes resultados. Portanto, nossos resultados sugerem que o desenvolvimento da tolerância rápida para a perda da coordenação motora ao etanol em camundongos é modulado pela ativação dos receptores A1.

Por outro lado, estudos têm mostrado que estímulos condicionados desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de tolerância ao etanol, sugerindo o envolvimento do aprendizado nas respostas compensatórias induzidas pelo etanol (Chen, 1968; LeBlanc et al., 1973; Crowell et al., 1981). A oportunidade de praticar uma tarefa sob o efeito do etanol facilita a tolerância para os efeitos hipotérmicos (Le et al., 1979), bem como para os efeitos sobre a coordenação motora de animais (Chen, 1968; Bitrán e Kalant, 1991).

Como descrito na Introdução, o aumento de dopamina no núcleo accumbens, uma importante estrutura ligada ao sistema de recompensa, na antecipação de consumo ou durante a exposição ao etanol, sinaliza a presença do reforço, levando o animal a um estado de alerta, onde o processo associativo de aprendizado e a evocação de comportamentos direcionados à procura do reforço estariam facilitados (González et al., 2004).

Desta maneira, certas condições experimentais, assim como fatores ambientais (não farmacológicos), apresentam um papel importante no desenvolvimento, não só da tolerância, como também de outros aspectos que levam à dependência as drogas de abuso (Fillmore e Vogel-Sprott, 1998; Bartholow et al., 2003).

Segundo a teoria proposta por Robinson e Berridge (1993), a administração repetida de drogas de abuso induz neuroadaptações no organismo, alterando de maneira duradoura o funcionamento dos sistemas de recompensa “sensibilizados” à droga e aos estímulos a ela associados, promovendo comportamentos compulsivos de busca e consumo da droga (Robinson e Berridge, 1993).

Uma resposta fisiológica condicionada e a sensação de intenso desejo (fissura) podem ocorrer quando usuários abstinentes encontram sinais preditivos de consumo e disponibilidade pela droga (Childress et al., 1988). Esta associação “aprendida” entre os sinais ambientais e os efeitos de reforço (positivos e negativos) gerados por substâncias psicoativas é um importante componente da dependência em humanos (Vanderschuren e Everitt, 2004).

Estudos buscando demonstrar o envolvimento dos receptores de adenosina nas propriedades motivacionais de consumo do etanol têm sido conflitantes. Arolfo e colaboradores (2004) mostraram que o antagonista dos receptores A2A DMPX apresenta um efeito bifásico na modulação do consumo de etanol: 10,0 e 20,0 mg/kg diminuem, enquanto 1,0 mg/kg aumentam o consumo de etanol em ratos machos Long Evans, fornecendo a primeira evidência farmacológica que os receptores A2A podem regular o consumo de etanol em roedores (Arolfo et al., 2004).

No entanto, estudos com camundongos KO do receptor A2A, assim como KO do transportador responsável pelo transporte passivo de adenosina (equilibrative nucleotide transporter type 1, ENT1), mostraram que estes animais são menos sensíveis aos efeitos agudos do etanol e consomem mais etanol comparado com o grupo controle, confirmando a hipótese que a sensibilidade ao etanol é um bom parâmetro preditivo para o desenvolvimento do alcoolismo (Naassila et al., 2002; Choi et al., 2004).

Uma técnica que evidencia as propriedades reforçadoras das drogas, independentemente do comportamento de auto-administração, é a do pareamento dos efeitos da droga com determinado contexto ambiental que, posteriormente (passado o efeito da droga), será apresentado ao animal em



situação de escolha (Bozarth, 1991; Tzschentke, 1998; Cunningham et al., 2000). O condicionamento de lugar é um procedimento Pavloviano comumente utilizado para avaliar os efeitos de reforço (positivos ou negativos) gerados por substâncias psicoativas (Tzschentke, 1998; Chester e Cunningham, 2002).

Existe um grande número de evidências mostrando que o etanol, dependendo do protocolo experimental e doses empregadas, induz preferência condicionada de lugar em diversas linhagens de camundongos (Cunningham et al., 1991; Crabbe et al., 1992; Cunningham et al., 1992; Boyce-Rustay e Cunningham, 2004; Bechtholt e Cunningham, 2005; Font et al., 2006). No presente estudo, foi confirmado que o etanol na dose de 2,0 g/kg, mas não nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg, promoveu uma significativa aquisição e expressão da preferência condicionada de lugar, quando comparado com o grupo controle.

Os resultados do presente estudo mostram ainda que a cafeína (10,0, 20,0 e 30,0 mg/kg, i.p.) não alterou a aquisição nem a expressão da preferência de lugar ao etanol, sugerindo que o sistema adenosinérgico, ao menos em parte, apresenta um pequeno papel na modulação dos efeitos motivacionais do etanol. Estes resultados contrastam com estudos anteriores, que têm demonstrado que a administração de baixas doses tanto de agonistas quanto de antagonistas dos receptores para adenosina, incluindo a cafeína, diminuem a expressão da preferência condicionada de lugar induzida pela cocaína (Poleszak e Malec, 2002), e anfetamina (Poleszak e Malec, 2003), sugerindo um envolvimento do sistema adenosinérgico nas propriedades reforçadoras e gratificantes de drogas com potencial de abuso.

A investigação dos efeitos motivacionais da cafeína e de agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina, tem demonstrado que estes compostos apresentam, dependendo da dose e do protocolo experimental de preferência de lugar utilizado, propriedades tanto de reforço positivo quanto aversivo em camundongos (Steigerwald et al., 1988; Brockwell et al., 1991; Brockwell e Beninger, 1996; Zarrindast e Moghadamnia, 1997). Entretanto, no presente estudo, nenhuma das

doses de cafeína testadas (10,0; 20,0 ou 30,0 mg/kg, i.p.) apresentaram propriedades motivacionais quando avaliadas no nosso paradigma experimental. Estas discrepâncias nos resultados utilizando cafeína per se podem ser explicados pelas diferenças nos protocolos experimentais (procedimento com viés versus sem viés, diferentes sinais contextuais, diferente duração da sessão de condicionamento, bem como diferentes linhagens de roedores utilizadas).

Todavia, são necessários estudos adicionais com outros agentes seletivos do receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, ou de outras doses de ZM241385, para descartar completamente o envolvimento deste subtipo de receptor em comportamentos relacionados à ansiedade, bem como nos mecanismos de tolerância e nas propriedades motivacionais do etanol.

Embora não tenham sido medidos os níveis sanguíneos ou encefálicos de etanol em animais tratados com os agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina, utilizados no presente estudo, uma possível interação farmacocinética entre estes compostos e a ressaca do etanol pode ser descartada, uma vez que estes compostos foram administrados aproximadamente 18 h após a injeção de etanol (4,0 g/kg, i.p.), tempo em que o etanol já foi completamente eliminado do organismo. Além disso, estudos anteriores mostraram que camundongos KO dos receptores de adenosina não apresentam alterações significantes nos níveis sanguíneos de etanol (El Yacoubi et al., 2001).

Em vista da sua complexidade, o tratamento do alcoolismo, uma doença crônica que envolve fatores genéticos, psicossociais e ambientais, produzindo diversas e importantes neuroadaptações no SNC, consistem no conjunto de intervenções psicológicas, sociais e farmacoterapêuticas, que tem como principal objetivo reduzir a dependência física, o desejo e a recaída ao consumo de etanol. Até o presente momento, os fármacos utilizados no tratamento e prevenção da dependência ao etanol são o disulfiram, acamprosato e naltrexona, que embora não sejam eficazes para todos os dependentes, são medicamentos aprovados nos Estados Unidos e na maioria dos países europeus (Kiefer e Mann, 2005). Desta maneira, a investigação de novos alvos farmacológicos pode vir a

originar terapias alternativas para o tratamento e prevenção das diversas alterações promovidas pela exposição crônica ao etanol.

Em conclusão, os resultados do presente estudo confirmam e estendem o envolvimento dos receptores de adenosina no controle da ansiedade, e mostram pela primeira vez, que os receptores A1 modulam importantes aspectos envolvidos no desenvolvimento do alcoolismo, como nas ações ansiolíticas de seu uso, ansiogênicas verificadas após a retirada do etanol, assim como no processo de tolerância ao etanol, sem, no entanto, interferir nos efeitos de reforço positivo induzidos pelo etanol. Em conjunto, estes resultados sugerem o potencial da manipulação farmacológica do sistema adenosinérgico para atenuar os efeitos do uso do etanol, assim como no tratamento do alcoolismo (Figura 23).

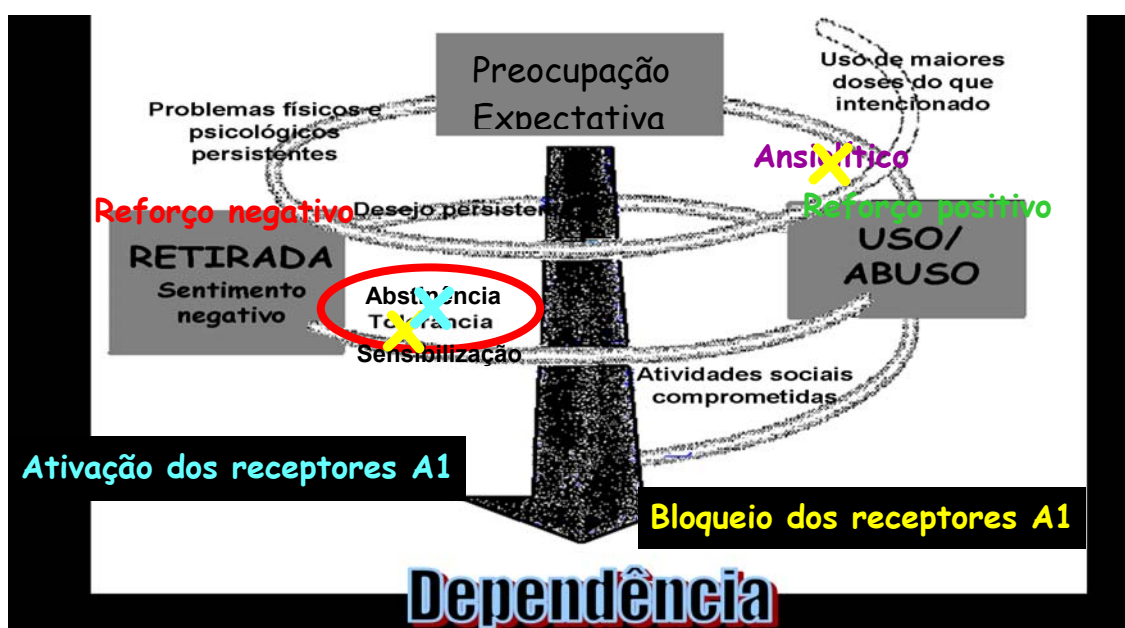


Figura 23. Diagrama (adaptado de Koob e Le Moal, 1997) ilustrando a participação dos receptores A1 de adenosina no ciclo da dependência ao etanol. O bloqueio dos receptores A1 inibe o efeito ansiolítico e a tolerância rápida ao etanol (Amarelo), enquanto que a ativação destes receptores reduz a ansiedade induzida pela abstinência do etanol (Azul).

## 6. CONCLUSÕES

- O efeito tipo-ansiolítico induzido pelo etanol é modulado pelos receptores de adenosina A1, mas não pelos receptores A2A, indicando uma interação funcional entre o sistema adenosinérgico e o etanol em comportamentos relacionados à ansiedade.
- Camundongos manifestam um comportamento tipo-ansio gênico, verificado pela redução da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado, 12 e 18 h após administração aguda de etanol (4 g/kg).
- A ativação dos receptores de adenosina A1, mas não A2A, reduz as respostas de ansiedade observadas durante abstinência (ressaca) do etanol em camundongos testados no labirinto em cruz elevado.
- O desenvolvimento de tolerância rápida à perda da coordenação motora ao etanol é modulado pelos receptores de adenosina A1, mas não pelos receptores A2A, desde que esta resposta adaptativa foi bloqueada pela administração aguda de DPCPX, um antagonista seletivo destes receptores.
- O bloqueio não-seletivo dos receptores de adenosina atenuou a aquisição, mas não a expressão da preferência condicionada de lugar ao etanol.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlijanian MK; Takemori AE. Effects of (-)-N6-(R-phenylisopropyl)-adenosine (PIA) and caffeine on nociception and morphine-induced analgesia, tolerance and dependence in mice. *Eur J Pharmacol* 112: 171-179, 1985.
- Alsene K; Deckert J; Sand P; De Wit H. Association between A2A receptor gene polymorphisms and caffeine-induced anxiety. *Neuropsychopharmacology* 28: 1694-1702, 2003.
- American Psychiatric Association and Task Force on DSM-IV. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-RT. Washington, DC, 4th edition. American Psychiatric Association, 2000.
- Amico JA; Mantella RC; Vollmer RR; Li X. Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J Neuroendocrinol* 16: 319-324, 2004.
- Appel SB; Liu Z; Mcelvain MA; Brodie MS. Ethanol excitation of dopaminergic ventral tegmental area neurons is blocked by quinidine. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 437-446, 2003.
- Arolfo MP; Yao L; Gordon AS; Diamond I; Janak PH. Ethanol operant self-administration in rats is regulated by adenosine A2 receptors. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1308-1316, 2004.
- Baldwin HA; Johnston AL; File SE. Antagonistic effects of caffeine and yohimbine in animal tests of anxiety. *Eur J Pharmacol* 159: 211-215, 1989.
- Ballard HS. The hematological complications of alcoholism. *Alcohol Health Res World* 21: 42-52, 1997.
- Ballarin M; Fredholm BB; Ambrosio S; Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand* 142: 97-103, 1991.
- Barbosa AD, Morato GS. Influence of neurosteroids on the development of rapid tolerance to ethanol in mice. *Eur J Pharmacol* 431: 179-188, 2001.

Bartholow BD; Pearson M; Sher KJ; Wieman LC; Fabiani M; Gratton G. Effects of alcohol consumption and alcohol susceptibility on cognition: a psychophysiological examination. *Biol Psychol* 64: 167-190, 2003.

Barwick VS; Dar MS. Adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in the rat motor cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 22: 587-607, 1998.

Bechtholt AJ; Cunningham CL. Ethanol-induced conditioned place preference is expressed through a ventral tegmental area dependent mechanism. *Behav Neurosci* 119: 213-223, 2005.

Bertoglio LJ; Carobrez AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 449-455, 2002.

Bhattacharya SK; Satyan KS; Chakrabarti A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol* 11: 219-224, 1997.

Bilkei-Gorzo A; Gyertyan I; Levay G. mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats – a new method for screening anxiolytic activity. *Psychopharmacology* 136: 291-298, 1998.

Birnbaumer L; Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *J Rec Signal Trans Res* 15: 213-252, 1995.

Bitrán M; Kalant H. Learning factor in rapid tolerance to ethanol – induced motor impairment. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 917-922, 1991.

Blatt SL; Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz J Med Biol Res* 32: 457-461, 1999.

Bode C; Bode JC. Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res* 29: 166S-171S, 2005.

Bode C; Bode JC. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. *Alcohol Health Res World* 21: 76-83, 1997.

- Bogin RM, Nostrant TT, Young MJ. Propranolol for the treatment of the alcoholic ressaca. *Am J Drug Alcohol Abuse* 12: 279-284, 1986.
- Boulouard M; Lelong V; Daoust M; Naassila M. Chronic ethanol consumption induces tolerance to the spatial memory impairing effects of acute ethanol administration in rats. *Behav Brain Res* 136: 239-246, 2002.
- Boyce-Rustay JM; Cunningham CL. The role of NMDA receptor binding sites in ethanol place conditioning. *Behav Neurosci* 118: 822-834, 2004.
- Bozarth MA. Evidence for the rewarding effects of ethanol using the conditioned place preference method. *Pharmacol Biochem Behav* 35: 485, 1991.
- Brasser SM; Spear NE. Physiological and behavioral effects of acute ethanol ressaca in juvenile, adolescent, and adult rats. *Behav Neurosci* 116: 305-320, 2002.
- Brockwell NT; Beninger RJ. The differential role of A1 and A2 adenosine receptor subtypes in locomotor activity and place conditioning in rats. *Behav Pharmacol* 7: 373-383, 1996.
- Brockwell NT; Eikelboom R; Beninger RJ. Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 513-517, 1991.
- Brundege JM; Dunwiddie TV. Metabolic regulation of endogenous adenosine release from single neurons. *Neuroreport* 9: 3007-3011, 1998.
- Burns M; Moskowitz H. Two experiments on alcohol-caffeine interaction. *Alcohol. Drugs and Driving* 5: 303-315, 1990.
- Cardoso RA; Brozowski SJ; Chavez-Noriega LE; Harpold M; Valenzuela CF; Harris RA. Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 774-780, 1999.

Carlsson A; Lidqvist M. Effect of ethanol on the hydroxylation of tyrosine and tryptophan in rat brain in vivo. *J Pharmacy Pharmacol* 25: 437-440, 1973.

Carmichael FJ; Israel Y; Crawford M; Minhas K; Saldivia V; Sandrin S; Campisi P; Orrego H. Central nervous system effects of acetate: contribution to the central effects of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 403-408, 1991.

Carobrez AP; Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-1205, 2005.

CEBRID – Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. In. I Levantamento Domiciliar de Consumo de Entorpecentes. UNIFESP-EPM. 2002.

Chandler LJ. Ethanol and brain plasticity: receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacol Ther* 99: 311-326, 2003.

Chandler LJ; Harris RA; Crews FT. Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *TiPS* 19: 491-495, 1998.

Chen CS. A study of the alcohol-tolerance effect and an introduction of a new behavioural technique. *Psychopharmacologia* 12: 433-440, 1968.

Chester JA; Cunningham CL. GABA(A) receptor modulation of the rewarding and aversive effects of ethanol. *Alcohol* 26: 131-143, 2002.

Childress AR; McLellan AT; Ehrman R; O'Brien CP. Classically conditioned responses in opioid and cocaine dependence: a role in relapse? *NIDA Res Monogr* 84: 25-43, 1988.

Choi DS; Cascini MG; Mailliard W; Young H; Paredes P; McMahon T; Diamond I; Bonci A; Messing RO. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. *Nat Neurosci* 7: 855-861, 2004.

Clark M; Dar MS. Mediation of acute ethanol-induced motor disturbance by cerebellar adenosine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 30: 155-161, 1988.



- Cloninger CR. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236: 410-416, 1987.
- Cohen C; Perrault GH; Sanger DJ. Evidence for the involvement of dopamine receptors in ethanol – induced hyperactivity in mice. *Neuropharmacology* 36: 1099-1108, 1997.
- Concas A; Cuccheddu T; Floris S; Mascia MP; Biggio G. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA), an adenosine A1 receptor agonist, suppressed ethanol withdrawal syndrome in rats. *Alcohol Alcohol* 29: 261-264, 1994.
- Conger JJ. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Quart J Stud Alcohol* 18: 296-305, 1956.
- Crabbe JC; Rigter H; Uijlen J; Strijbos C. Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 208: 128–133, 1979.
- Crabbe JC; Phillips TJ; Cunningham CL; Belknap JK. Genetic determinants of ethanol reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654: 302-310, 1992.
- Crabbe JC; Belknap JK; Buck KJ. Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264: 1715-1723, 1994.
- Craig CG; Temple SD; White TD. Is cyclic AMP involved in excitatory amino acid-evoked adenosine release from rat cortical slices? *Eur J Pharmacol* 269: 79-85, 1994.
- Crawley JN; Patel J; Marangos PJ. Adenosine uptake inhibitors potentiate the sedative effects of adenosine. *Neurosci Lett* 36: 169-174, 1983.
- Crowell CR; Hinson RE; Siegel S. The role of conditional drug responses in tolerance to the hypothermic effects of ethanol. *Psychopharmacology* 73:51-54, 1981.
- Cunha RA; Sebastiao AM; Ribeiro JA. Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci* 18: 1987-1995, 1998.

Cunningham CL; Ferree NK; Howard MA. Apparatus bias and place conditioning with ethanol in mice. *Psychopharmacology* 170: 409-422, 2003.

Cunningham; CL; Howard MA; Gill SJ; Rubinstein M; Low MJ; Grandy DK. Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 693-699, 2000.

Cunningham CL; Hallett CL; Niehus DR; Hunter JS; Nouth L; Risinger FO. Assessment of ethanol's hedonic effects in mice selectively bred for sensitivity to ethanol-induced hypothermia. *Psychopharmacology* 105: 84-92, 1991.

Cunningham CL; Losli SM; Risinger FO. Context-drug pairings enhance tolerance to ethanol-induced disruption of operant responding. *Psychopharmacology* 109: 217-222, 1992.

Da Silva GE; Morato GS; Takahashi RN. Rapid tolerance to delta(9)-tetrahydro cannabinol and cross-tolerance between ethanol and delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Eur J Pharmacol* 431: 201-207, 2001.

Da Silva GE; Vendruscolo LF; Takahashi RN. Effects of ethanol on locomotor and anxiety-like behaviors and the acquisition of ethanol intake in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 77: 693-706, 2005.

Daly JW; Butts-Lamb P; Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol* 3: 69-80, 1983.

Daly JW; Shi D; Wong V; Nikodijevic O. Chronic effects of ethanol on central adenosine function of mice. *Brain Res* 650: 153-156, 1994.

Daly JW. *Cyclic nucleotides in the nervous system*. Plenum, New York, 1977.

Dar MS; Clark M. Tolerance to adenosine's accentuation of ethanol-induced motor incoordination in ethanol-tolerant mice. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 1138-1146, 1992.

Dar MS; Mustafa SJ; Wooles WR. Possible role of adenosine in the CNS effects of ethanol. *Life Sci* 33: 1363-1374, 1983.

Dar MS. Central adenosinergic system involvement in ethanol-induced motor incoordination in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 1202-1209, 1990

Dar MS. Brain adenosinergic modulation of acute ethanol-induced motor impairment. *Alcohol Alcohol Suppl* 2: 425-429, 1993.

Dawson GR; Tricklebank MD. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 16: 33-36, 1995.

Deckert J; Bisslerbe JC; Klein E; Marangos PJ. Adenosine uptake sites in brain: regional distribution of putative subtypes in relationship to adenosine A1-receptors. *J Neurosci* 8: 2338-2349, 1988.

Dolphin AC; Prestwich SA. Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature* 316: 148-150, 1985.

Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 411-418, 2003.

Drake CL; Roehrs T; Turner L; Scofield HM; Roth T. Caffeine reversal of ethanol effects on the multiple sleep latency test, memory, and psychomotor performance. *Neuropsychopharmacology* 28: 371-378, 2003.

Dunwiddie TV. The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* 27: 63-139, 1985.

Dunwiddie TV; Diao L. Extracellular adenosine concentrations in hippocampal brain slices and the tonic inhibitory modulation of evoked excitatory responses. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 537-545, 1994.

Dunwiddie TV; Diao L; Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7673-7682, 1997.

Dunwiddie TV; Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24 :31-55, 2001.

El Yacoubi M; Ledent C; Parmentier M; Costentin J; Vaugeois JM. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A2A adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology* 148: 153-163, 2000.

El Yacoubi M; Ledent C; Parmentier M; Daoust M; Costentin J; Vaugeois JM. Absence of the adenosine A2A receptor or its chronic blockade decrease ethanol withdrawal-induced seizures in mice. *Neuropharmacology* 40: 424-432, 2001.

El Yacoubi M; Ledent C; Parmentier M; Costentin J; Vaugeois JM. Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology* 45: 977-985, 2003.

El-Ghundi M; George SR; Drago J; Fletcher PJ; Fan T; Nguyen T; Liu C; Sibley DR; Westphal H; O'Dowd BF. Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behaviour. *Eur J Pharmacol* 353: 149–158, 1998.

Emanuele N; Emanuele MA. The endocrine system: alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol Health Res World* 21: 53-64, 1997.

Everitt, B.J.; Wolf, M.E. Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* 22: 3312-3320, 2002.

Fadda, F.; Rossetti, Z.L. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56: 385-431, 1998.

Feoktistov I; Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* 49: 381-402, 1997.

Fernandes C; File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 31-40, 1996.

Ferreira, V.M.M., Takahashi, R.N., Morato, G.S. Dexamethasone reverses the ethanol-induced anxiolytic effect in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66: 585-590, 2000.

File SE, Andrews N, Al-Farhan M, Wu PY. The role of 5-HT in the anxiogenic effects of acute ethanol withdrawal and in the long-lasting cognitive deficits. *Alcohol Alcohol* 2: 495-499, 1993.

File SE, Hyde J, Pool M. Effects of ethanol and chlordiazepoxide on social interaction in rats. *Br J Pharmacol* 58: 465P, 1976.

File SE, Zharkovsky A, Gulati K. Effects of baclofen and nitrendipine on ethanol withdrawal responses in the rat. *Neuropharmacology* 30: 183-190, 1991.

File SE. Usefulness of animal models with newer anxiolytics. *Clin Neuropharmacol* 15: 525A-526A, 1992.

File, S.E., Hyde, J., Pool, M. Effects of ethanol and chlordiazepoxide on social interaction in rats. *Br J Pharmacol* 58: 465P, 1976.

Fillmore MT; Vogel-Sprott M. Behavioral effects of combining alcohol and caffeine: The contribution of drug-related expectancies. *Exp Clin Psychopharmacol* 3: 33-38, 1995.

Fillmore MT; Vogel-Sprott M. Behavioral impairment under alcohol: cognitive and pharmacokinetic factors. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1476-1482, 1998.

Fillmore MT. Alcohol tolerance in humans is enhanced by prior caffeine antagonism of alcohol-induced impairment. *Exp Clin Psychopharmacol* 11: 9-17, 2003.

Finn DA, Crabbe JC. Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol Health Res World* 21: 149-156, 1997.

Flint, J. Animal models of anxiety and their molecular dissection. *Semin Cell Devel Biol* 14: 37-42, 2003.

Florio, C., Prezioso, A., Papaioannou, A., Vertua, R. Adenosine A1 receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology* 136: 311-319, 1998.

Font L; Aragon CM; Miguel M. Ethanol-induced conditioned place preference, but not aversion, is blocked by treatment with D: -penicillamine, an inactivation agent for acetaldehyde. *Psychopharmacology* 184: 56-64, 2006.

Franks HM, Hagedorn H, Hensley VR, Hensley WJ, Starmer GA. The effect of caffeine on human performance, alone and in combination with ethanol. *Psychopharmacology* 45: 177-181, 1975.

Fredholm BB, Proctor W, Van der Ploeg I, Dunwiddie TV. In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 172: 249-262, 1999.

Fredholm BB; Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9: 130-134, 1988.

Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552, 2001.

Fredholm, B.B.; Proctor, W.; Van der Ploeg, I.; Dunwiddie, T.V. In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 172: 249-262, 1989.

Frey, G.D.; Chapin, R.E.; Vogel, R.A.; Mailman, R.B.; Kilts, C.D.; Mueller, R.A.; Breese, G.R. Effects of acute and chronic 1,3-butanediol treatment on central nervous system function: a comparison with ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 306-314, 1981.

Gale C; Martyn C. Tobacco, coffee, and Parkinson's disease. *BMJ* 326: 561-562, 2003.

Gatch MB, Lal H. Animal models of the anxiogenic effects of ethanol withdrawal. *Drug Dev Res* 54: 95-115, 2001.

Gatch MB, Wallis CJ, Lal H. Effects of NMDA antagonists on ethanol withdrawal induced “anxiety” in the elevated plus maze. *Alcohol* 19: 207-211, 1999.

Gatch, M.B., Wallis, C.J., Lal, H. The effects of adenosine ligands R-PIA and CPT on ethanol withdrawal. *Alcohol* 19: 9-14, 1999.

Gauvin DV, Goulden KL, Holloway FA. State-dependent stimulus control: cueing attributes of ethanol “ressaca” in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 1210-1214, 1993.

Gauvin DV, Youngblood BD, Holloway FA. The discriminative stimulus properties of acute ethanol withdrawal (ressaca) in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 336-341, 1992.

Gessa, G.L.; Muntoni, F.; Collu, M.; Vargiu, L.; Mereu, G. Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348: 201-203, 1985.

Gimenez-Llort, L., Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Fredholm, B.B., Tobena, A., Pekny, M. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16, 547-550, 2002.

Givens B; McMahon K. Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Res* 688: 27-33, 1995.

González RA; Jaworski JN. Alcohol and glutamate. *Alcohol Health & Research World* 21: 120-126, 1997.

Gonzales RA; Job MO; Doyon WM. The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement. *Pharmacol Ther* 103: 121-146, 2004.

Goodman. R.R.; Snyder, S.H. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. *J Neurosci* 2: 1230-1241, 1982.

Graeff FG; Parente A; Del-Ben CM; Guimaraes FS. Pharmacology of human experimental anxiety. *Braz J Med Biol Res* 36: 421-432, 2003.

- Grobin AC; Matthews DB; Devaud LL; Marrow AI. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology* 139: 2-19, 1998.
- Griffiths RR; Mumford GK. Caffeine – a drug of abuse? In: Bloom FE, Kupfer DJ (Eds). *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, New York, pp. 1699-1714, 1995.
- Hack SP; Christie MJ. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit Rev Neurobiol* 15: 235-74, 2003.
- Hamilton SP, Slager SL, De Leon AB, Heiman GA, Klein DF, Hodge SE, Weissman MM, Fyer AJ, Knowles JA. Evidence for genetic linkage between a polymorphism in the adenosine 2A receptor and panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 558-565, 2004.
- Hanchar HJ; Wallner M; Olsen RW. Alcohol effects on gamma-aminobutyric acid type A receptors: are extrasynaptic receptors the answer? *Life Sci* 76: 1-8, 2004.
- Hasenfratz, M.; Bunge, A.; Dal Prá, G; Bättig, K. Antagonistic effects of caffeine and alcohol on mental performance parameters. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 463-465, 1993.
- Hauber W; Munkle M. The adenosine receptor antagonist theophylline induces a monoamine-dependent increase of the anticataleptic effects of NMDA receptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354: 179-186, 1996.
- Heinz A; Schafer M; Higley JD; Krystal JH; Goldman D. Neurobiological correlates of the disposition and maintenance of alcoholism. *Pharmacopsychiatry* 36: S255-258, 2003.
- Holland, HC; Weldon, E. A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. *Acta Psychol* 28: 293– 300, 1968.
- Honse, Y.; Ren, H.; Lipsky, R.H.; Peoples, R.W. Sites in the fourth membrane-associated domain regulate alcohol sensitivity of the NMDA receptor. *Neuropharmacology* 46: 647-654, 2004.



Hungund BL; Basavarajappa BS. Distinct differences in the cannabinoid receptor binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption. *J Neurosci Res* 60: 122-128, 2000.

Hyman SE; Malenka RC. Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2: 695-703, 2001.

Imaizumi M; Miyazaki S; Onodera K. Effects of xanthine derivatives in a light-dark test in mice and the contribution of adenosine receptors. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 16: 639-644, 1994.

Imperto A; Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 212-228, 1986.

Imperato A, Dazzi L, Carta G, Colombo G, Biggio G. Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. *Brain Res* 784: 347-350, 1998.

Jain, N., Kemp, N., Adeyemo, O., Buchanan, P., Stone, T.W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 116: 2127-2133, 1995.

Jarvis MF, Becker HC. Single and repeated episodes of ethanol withdrawal increase adenosine A<sub>1</sub>, but not A<sub>2A</sub>, receptor density in mouse brain. *Brain Res* 786: 80-88, 1998.

Jian R; Cortot A; Ducrot F, Jobin G; Chavvialle JA; Modigliani R. Effect of ethanol ingestion on postprandial gastric emptying and secretion, biliopancreatic secretions, and duodenal absorption in man. *Dig Dis Sci* 31: 604-614, 1986.

Jin S; Johansson B; Fredholm BB. Effects of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptor activation on electrically evoked dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 801-808, 1993.

Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 9407-9412, 2001.

- Kaiser SM; Quinn RJ. Adenosine receptors as potential therapeutic targets. *Drug Discov Today* 4: 542-551, 1999.
- Kalant H. Current state of knowledge about the mechanisms of alcohol tolerance. *Addict Biol* 1: 133-141, 1996.
- Kalant H. Research on tolerance: what can we learn from history? *Alcohol Clin Exp Res* 22: 67-76, 1998.
- Kalant, H.; Khanna, J.M. Methods for the study of tolerance. In: Adler, M.W.; Cowan, A. *Modern methods in pharmacology. Testing and Evaluation of Drugs of Abuse* 6: 43-66, 1990.
- Kalant, H.; LeBlanc, A.E.; Gibbins, R.J. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol Rev* 23: 135-191, 1971.
- Kaplan GB, Sears MT. Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacology* 123: 64-70, 1996.
- Kaplan GB, Bharmal NH, Leite-Morris KA, Adams WR. Role of adenosine A1 and A2A receptors in the alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol* 19: 157-162, 1999.
- Kelai S; Aissi F; Lesch KP; Cohen-Salmon C; Hamon M; Lanfurney L. Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol* 38: 386-389, 2003.
- Khanna JM, Chau A, Shah G. Characterization of the phenomenon of rapid tolerance to ethanol. *Alcohol* 13: 621-628, 1996.
- Khanna JM, Morato GS, Kalant H. Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 291-298, 2002.
- Khanna JM, Morato GS, Kalant H. Effect of NMDA antagonists, an NMDA agonist, and serotonin depletion on acute tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 291-298, 2002.

Khanna, J.M.; Kalant, H.; Shah, G.; Weiner, J. Rapid tolerance as an index of chronic tolerance. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 427-432, 1991.

Khanna JM, Morato GS, Shah G, Chau A, Kalant H. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol. *Brain Res Bull* 32: 43–47, 1993.

Khanna JM, Morato GS, Chau A, Shah G, Kalant H. Effect of NMDA antagonists on rapid and chronic tolerance to ethanol: importance of intoxicated practice. *Pharmacol Biochem Behav* 48: 755–763, 1994.

Kiefer F; Mann K. New achievements and pharmacotherapeutic approaches in the treatment of alcohol dependence. *Eur J Pharmacol* 526: 163-171, 2005.

Kiselevski Y, Oganessian N, Zimatkin S, Sautowicz A, Angielski S, Niezabitowski P, Uracz W, Gryglewski RJ. Acetate metabolism in brain mechanisms of adaptation to ethanol. *Med Sci Monit* 9: 178-182, 2003.

Kliethermes CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 837-50, 2005.

Knapp DJ, Saiers JA, Pohorecky LA. Observations of novel behaviors as indices of ethanol withdrawal-induced anxiety. *Alcohol Alcohol (Suppl)* 2: 489-493, 1993.

Koob GF. Alcoholism: allostasis and beyond. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 232-243, 2003.

Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacol Sci* 13: 177-184, 1992.

Koob GF.; Roberts, A.J.; Schulteis, G.; Parsons, L.H.; Heyser, C.H.; Hyytia, P.; Merlo-Pich, E.; Weiss, F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 3-9, 1998.

Koob GF, Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-128, 2001.

- Krauss SW, Ghirnikar RB, Diamond I, Gordon AS. Inhibition of adenosine uptake by ethanol is specific for one class of nucleoside transporters. *Mol Pharmacol* 44: 1021-1026, 1993.
- Krystal JH; Petrakis IL; Krupitsky E; Schutz C; Trevisan L; D'Souza DC. NMDA receptor antagonism and the ethanol intoxication signal: from alcoholism risk to pharmacotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 176-184, 2003.
- Kull, B.; Svenningsson, P.; Fredholm, B.B. Adenosine A2A receptors are colocalized with and activate golf in rat stratum. *Mol Pharmacol* 58: 771-777, 2000.
- Kuzmin A, Sandin J, Terenius L, Ogren SO. Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice: effects of opioid receptor-like 1 receptor agonists and naloxone. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 310-318, 2003.
- LaBuda, C.J., Fuchs, PN. Catecholamine depletion by reserpine blocks the anxiolytic actions of ethanol in the rat. *Alcohol* 26: 55-59, 2002.
- Lal H, Prather PL, Rezazadeh SM. Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by buspirone. *Alcohol* 8: 467-471, 1991.
- Lang, U.E., Lang F., Richter, K., Vallon, V., Lipp, H.P., Schnermann, J., Wolfer, D.P. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knockout mice. *Behav Brain Res* 145: 179-188, 2003.
- Latini S; Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-484, 2001.
- Le AD; Khanna JMLA; Khanna JM. Dispositional mechanisms in drug tolerance and sensitization. *Psychoactive Drugs* 281-351, 1989.
- Le AD; Poulos CX; Cappell H. Conditioned tolerance to the hypothermic effect of ethyl alcohol. *Science* 206: 1109-1110, 1979.

- LeBlanc AE; Gibbins RJ; Kalant H. Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacologia* 30: 117-122, 1973.
- Ledent C., Vaugeois, J.M., Schiffmann, S.N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J.J., Costentin, J., Heath, J.K., Vassart, G., Parmentier, M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2A receptor. *Nature* 388: 674-678, 1997.
- Leite, P. Acidentes automobilísticos e oportunidade para o tratamento do alcoolismo. Disponível em: [www.graciasdoctor.com.br/sections/mental/alcoholism](http://www.graciasdoctor.com.br/sections/mental/alcoholism)
- Liguori A; Robinson JH.. Caffeine antagonism of alcohol-induced driving impairment. *Drug and Alcohol Dependence* 63: 123-129, 2001.
- Liljequist, S. The competitive NMDA receptor antagonist, CGP-39551, inhibits ethanol withdrawal seizures. *Eur J Pharmacol* 192: 197-198, 1991.
- Lister, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180-185, 1987.
- Littleton, J.M. The assessment of rapid tolerance to ethanol. In: Rigter, H.; Crabbe, J.C. *Alcohol Tolerance and dependence* 53-79, 1980.
- Lorist, M.M; Tops, M. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain Cognition* 53: 82-94: 2003.
- Lovinger DM; Crabbe JC. Laboratory models of alcoholism: treatment target identification and insight into mechanisms. *Nat Neurosci* 8: 1471-1480, 2005.
- Mailliard, W.S; Diamond, I. Recent advances in the neurobiology of alcoholism: the role of adenosine. *Pharmacol Therap* 101: 39-46, 2004.
- McCloskey, T.V., Damian, G.M., Brown, B.D., Barraco, R.A., Altman, H.J. Antagonism of the anti-conflict effects of phenobarbital, but not diazepam, by the A1 adenosine agonist R-PIA. *Psychopharmacology* 102: 283-290, 1990.

Meng ZH; Dar MS. Possible role of striatal adenosine in the modulation of acute ethanol-induced motor incoordination in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 892-901, 1995.

Meng ZH; Dar MS. Intrastratial Ro15-4513 functionally antagonizes ethanol-induced motor incoordination and striatal adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 524-534, 1994.

Mereu, G.; Fadda, F.; Gessa, G.L. Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Research* 292: 63-69, 1984.

Millan, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70: 83-244, 2003.

Moreau JL; Huber G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Rev* 31: 65-82, 1999.

Morrisetti, R.A.; Swartzwelder, H.S. Attenuation of hippocampal long-term potentiation by ethanol: a patch-clamp analysis of glutamatergic and GABAergic mechanisms. *J Neurosci* 13: 2264-2272, 1993.

Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C, Gordon AS. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem* 265: 1946-1951, 1990.

Naassila M; Ledent C; Daoust M. Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. *J Neurosci* 22: 10487-10493, 2002.

Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10: 201-217, 2001.

Newling, D.B., Thomson, J.B. Alcohol challenge with sons of alcoholics: a critical review and analysis. *Psychol Bull* 108: 383-402, 1990.

Nutt D. Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry* 175: 114-119, 1999.

Nutt, DJ. The pharmacology of human anxiety. *Pharmac Ther* 47: 233-266, 1990.

- O'Brien, C.P. Dependência e abuso de drogas. In Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W.; Gilman, A.G. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 9º ed, Editora McGraw Hill, 405-420, 1996.
- Olah, M.E.; Stiles, G.L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 581-606, 1995.
- Ongini E; Adami M; Ferri C; Bertorelli R. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 825: 30-48, 1997.
- Ongini E; Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17: 364-372, 1996.
- Organização Mundial de Saúde. Neurociência do uso de substâncias psicoativas e dependência, 2004.
- Patkina NA; Zvartau EE. Caffeine place conditioning in rats: comparison with cocaine and ethanol. *Eur Neuropsychopharmacology* 8: 287-291, 1998.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14: 149-167, 1985.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14: 149-167, 1985.
- Ploj, K.; Roman, E.; Kask, A.; Hyytiä, P.; Schiöth, H.B.; Wikberg, J.E.S.; Nylander, I. Effects of melanocortin receptor ligands on ethanol intake and opioid peptide levels in alcohol-preferring AA rats. *Brain Res Bull* 59: 97-104, 2002.
- Pohorecky, L.A. The interaction of alcohol and stress. A review. *Neurosci Biobehav* 5: 209-229, 1981.
- Poleszak E; Malec D. Adenosine receptor ligands and cocaine in conditioned place preference (CPP) test in rats. *Pol J Pharmacol* 54: 119-126, 2002.

- Poleszak E; Malec D. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists in amphetamine-induced conditioned place preference test in rats. *Pol J Pharmacol* 55: 319-326, 2003.
- Popoli P; Reggio R; Pezzola A. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 333: 143-146, 1997.
- Pritchard MT; Nagy LE. Ethanol-induced liver injury: potential roles for egr-1. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 146S-150S, 2005.
- Proctor WR; Dunwiddie TV. Behavioral sensitivity to purinergic drugs parallels ethanol sensitivity in selectively bred mice. *Science* 224: 519-521, 1984.
- Ramos, A; Mormède, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 33-57, 1998.
- Ribeiro JÁ; Cunha RA; Correia-de-Sa P; Sebastiao AM. Purinergic regulation of acetylcholine release. *Prog Brain Res* 109: 231-241, 1996.
- Ribeiro, J.A.; Sebastia, A.M.; De Mendonça, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* 68: 377-392, 2003.
- Risinger, F.O.; Freeman, P.A.; Rubinstein, M.; Low, M.J.; Grandy, D.K. Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology* 152: 343-350, 2000.
- Robinson TE; Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 18: 247-291, 1993.
- Rodgers RJ. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol* 8: 477-504, 1997.
- Ron D; Jurd R. The “ups and downs” of signaling cascades in addiction. *Sci STKE* 309: 1-16, 2005.
- Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur J Pharmacol* 283: 177-183, 1995.



- Salem A, Hope W. Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 671-679, 1997.
- Schuckit MA. Genetic aspects of alcoholism. *Ann Emerg Med* 15: 991-996, 1986.
- Schuckit MA. The treatment of stimulant dependence. *Addiction* 89: 1559-1563, 1994.
- Siggins GR; Martin G; Roberto M; Nie Z; Madamba S; De Lecea L. Glutamatergic transmission in opiate and alcohol dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1003: 196-211, 2003.
- Smith CM, Barnes GM. Signs and symptoms of ressaca: prevalence and relationship to alcohol use in a general adult population. *Drug Alcohol Depend* 11: 249-269, 1983.
- Snyder, S.H. Knockouts anxious for new therapy. *Nature* 388: 624, 1997.
- Spanagel R; Zieglgänsberger W. Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* 18: 54-59, 1997.
- Steigerwald ES; Rusiniak KW; Eckel DL; O'Regan MH. Aversive conditioning properties of caffeine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 579-584, 1988.
- Stewart, J.; Badiani, A. Tolerance and sensitization to the behavioral effect of drugs. *Behav Pharmacol* 4: 289-312, 1993.
- Tabakoff, B. Alcohol and tolerance. *Alcohol Alert*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA Press, Bethesda, Maryland, USA 28: 1-4, 1995.
- Tabakoff, B.; Hoffman, P.L. Biochemical Pharmacology of Alcohol. In: Meltzer, H.Y. (Raven Press, New York). *Psychopharmacology: The Third Generation Progress* 1521, 1987.
- Thorn JA; Jarvis SM. Adenosine transporters. *Gen Pharmacol* 27: 613-620, 1996.
- Treit D; Menard J; Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 463-469, 1993.

Tsai, G.; Gastfriend, D.R.; Coyle, J.T. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psych* 152: 332-340, 1995.

Tzschenke TM. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56: 613-672, 1998.

Vaillante, G.E. A história natural do alcoolismo revisitada. 1º ed, Editora Artes Médicas Sul, São Paulo, 1999.

Vanderschuren LJ, Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305: 1017-1019, 2004.

Varaschin RK; Wazlawick E; Morato GS. Systemic and intra-accumbens microinjections of naltrexone interfere with tolerance to ethanol in rats. *Psychopharmacology* 182: 366-374, 2005.

Varlinskaya EI, Spear LP. Acute ethanol withdrawal (ressaca) and social behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 40-50, 2004.

Varlinskaya, E.I., Spear, L.P. Acute effects of ethanol on social behavior of adolescent and adult rats: role of familiarity of the test situation. *Alcohol Clin Exp Res* 26: 1502-1511, 2002.

Waller, M.B.; McBride, W.J.; Lumeng, L.; Li, T.K. Initial sensitivity and acute tolerance to ethanol in the P and NP lines of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 683-688, 1983.

Wazlawick E, Morato GS. Influence of drugs acting on nitric oxide-dependent pathways on ethanol tolerance in rats. *Psychopharmacology* 170: 343–350, 2003.

Weiss F; Ciccocioppo R; Parsons LH; Katner S; Liu X; Zorrilla EP; Valdez GR; Ben-Shahar O; Angeletti S; Richter RR. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann N Y Acad Sci* 937 :1-26, 2001.

Weiss, F.; Porrino, L.J. Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J Neurosci* 22: 3332-3337, 2002.

Wiese JG, Shlipak MG, Browner WS. The alcohol ressaca. *Ann Intern Med* 132: 897-902, 2000.

Wise, R.A.; Bozarth, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psyc Rev* 94: 469-492, 1987.

Zaleski MJ, Nunes Filho JR, Lemos T, Morato GS. GABA(B) receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* 153: 415-424, 2001.

Zarrindast MR; Moghadamnia AA. Adenosine receptor agents and conditioned place preference. *Gen Pharmacol* 29: 285-289, 1997.

Zarrindast MR, Naghipour B, Roushan-zamir F, Shafaghi B. Effects of adenosine receptor agents on the expression of morphine withdrawal in mice. *Eur J Pharmacol* 369: 17-22, 1999.

Zeraati M; Mirnajafi-Zadeh J; Fathollahi Y; Namvar S; Rezvani ME. Adenosine A(1) and A(2A) receptors of hippocampal CA1 region have opposite effects on piriform cortex kindled seizures in rats. *Seizure* 15: 41-48, 2006.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 362: 299-309, 2000.

## **8. ANEXOS**

### **PUBLICAÇÃO DE PARTE DOS RESULTADOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS QUALIS “A”**

**“O presente trabalho foi impresso com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos”.**