

## **Análise comportamental do modelo animal de recaída ao uso de drogas *cue-induced***

*(Behavior analysis of the cue-induced animal model of drug relapse)*

**Fernanda Libardi Galesi, Maria Teresa de Araújo Silva & Miriam Garcia Mijares<sup>1</sup>**

Universidade de São Paulo  
(Brasil)

*(Received: August 18, 2011; accepted: December 09, 2011)*

Sabe-se hoje que evitar a recaída – retorno ao uso da droga após algum tempo de abstinência – é uma das etapas mais importantes do tratamento da dependência de álcool e de outras drogas (Associação Americana de Psiquiatria, 1994; Bachteler, Economidou, Danysz, Ciccocioppo, & Spanagel, 2005; Ciccocioppo, Sanna, & Weiss, 2001; Epstein, Preston, Stewart, & Shaham, 2006; O'Brien, Childress, Ehrman, & Robbins, 1998; Woody, McLellan, & O'Brien, 1990; Yan & Nabeshima, 2009; Zironi, Burattini, Aicardi, & Janak, 2006). Desta forma, diferentes procedimentos experimentais têm sido desenvolvidos em laboratórios com a finalidade de reproduzir em organismos não-humanos algumas das variáveis que podem produzir a recaída ao uso de drogas. Por tentarem simular alguns dos aspectos da recaída humana, esses procedimentos são frequentemente chamados de “modelos animais de recaída”.

Alguns dos fatores que podem levar à recaída ao uso de drogas e que têm sido mimetizados nos modelos animais de recaída são: a ingestão de uma pequena quantidade da droga (*priming effect*), a exposição a estressores (*exposure to stress*) e a exposição a estímulos ambientais que foram associados ao uso da droga (*cue-induced*) (Epstein, et al., 2006; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

De relevância para o presente trabalho é o modelo de indução pela dica ou *cue-induced*. O procedimento padrão deste modelo possui três fases experimentais. Na primeira fase, animais treinados a auto-administrar uma droga (álcool, cocaína, heroína, entre outras) são submetidos a um treino discriminativo com dois componentes diferentes, cada um apresentado em sessões experimentais distintas. Em um dos componentes, as pressões à barra na presença de um estímulo discriminativo ( $S^{D1}$ ) têm como consequência a apresentação de um reforçador condicionado ( $S^{R1}$ ) e a liberação da droga ( $S^{R1}$ ). No outro componente, pressões à barra na presença de um estímulo discriminativo ( $S^{D2}$ ) têm como consequência a apresentação de outro reforçador condicionado ( $S^{R2}$ ) e a liberação de água ou salina ( $S^{R2}$ ).<sup>2</sup> Na segunda fase, a resposta de pressão à barra é colocada em extinção na ausência dos estímulos discriminativos e dos reforçadores condicionados. Na terceira e última fase, chamada de “teste de reinstalação”, as condições da primeira fase são reintroduzidas em extinção, ou seja, as

1) Fernanda Libardi Galesi - Avenida Professor Mello Moraes, 1721 - Bloco A - sala A6 CEP 05508-030 - Cidade Universitária - São Paulo - SP - Brasil. Correspondências para fernanda.libardi@usp.br ou para mgarciam@usp.br. O presente trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

2) Geralmente, quando o álcool é a droga a ser estudada, são usados odores como estímulos discriminativos.

pressões à barra na presença do  $S^{D1}$  são seguidas do  $S^{S1}$  e as pressões à barra na presença do  $S^{D2}$  são seguidas do  $S^{S2}$ , porém os reforçadores primários (água ou droga) não são liberados. Desta forma, respostas dos sujeitos na presença de  $S^{D1}$  e  $S^{S1}$ , e não na presença de  $S^{D2}$  e  $S^{S2}$ , são consideradas como “respostas de procura pela droga”, indicativas de recaída induzida por esses estímulos ambientais.

A recaída ao uso de álcool tem sido estudada amplamente por o modelo *cue-induced*. O álcool ou etanol ocupa o segundo lugar entre as drogas mais consumidas no mundo (McKim, 2006). A forma pela qual atua no Sistema Nervoso Central (SNC) é bastante complexa. Uma de suas ações conhecidas é sobre os receptores de glutamato do tipo NMDA. O etanol bloqueia esses receptores, o que leva a uma diminuição da transmissão glutamatérgica. O etanol também tem efeito agonístico sobre receptores de serotonina do tipo 5-HT<sub>3</sub>. Esse efeito parece estar associado com aumento na liberação de dopamina no núcleo accumbens, que faz parte do chamado circuito do reforço, e com a função reforçadora do etanol (McKim, 2006). Ainda, o etanol modula o funcionamento de receptores de GABA<sub>A</sub>, aumentando a inibição produzida por esse neurotransmissor, o que tem sido relacionado com os efeitos sedativos e depressores do etanol. Também existem evidências de que o etanol modula a transmissão opióide, o que tem sido também relacionado com seu efeito reforçador (McKim, 2006). De fato, alguns estudos têm mostrado que a reinstalação da auto-administração de etanol, controlada por estímulos ambientais, é bloqueada por naltrexona, um antagonista competitivo dos receptores *Mu* (Katner & Weiss, 1999). Adicionalmente existem dados que sugerem que alterações na transmissão dopaminérgica, possivelmente moduladas pelo sistema opióide, estão associadas com o controle de estímulos sobre a auto-administração de etanol (Le & Shaham, 2002).

Os vários estudos que utilizaram o procedimento de recaída ao uso e drogas *cue-induced* com o álcool como reforçador, verificaram repetidamente que os estímulos discriminativos e reforçadores condicionados associados ao álcool reinstalavam a resposta de pressão à barra e que aqueles estímulos associados à água não reinstalavam essa resposta (Bachteler, et al., 2005; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo, Economidou, et al., 2004; Ciccocioppo, Lin, Martin-Fardon & Weiss, 2003; Ciccocioppo, Martin-Fardon, & Weiss, 2002; Ciccocioppo, et al., 2001; Williams & Schimmel, 2008).

É importante destacar que o modelo de recaída ao uso de drogas *cue-induced* é frequentemente utilizado para estabelecer linhas de base de desempenho sobre as quais são realizadas diferentes manipulações experimentais que pretendem desvendar os mecanismos neurofisiológicos dos processos envolvidos na recaída ao uso de etanol (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Porém, seu valor para a análise dos processos comportamentais da dependência de álcool é limitado, pois esse procedimento não diferencia a função dos estímulos discriminativos da função dos reforçadores condicionados na aquisição e manutenção do comportamento de auto-administrar o álcool (Fuchs, Lasseter, Ramirez & Xie, 2009).

Diante desse problema, o presente estudo teve como principal objetivo manipular parâmetros experimentais para analisar separadamente o controle dos estímulos discriminativos e dos reforçadores condicionados sobre a resposta de pressão à barra de ratos submetidos ao procedimento de recaída *cue-induced* utilizando-se o álcool como reforçador. Este estudo também teve como objetivos secundários replicar os dados dos testes de reinstalação obtidos por outros experimentos que utilizaram esse modelo animal com etanol (Bachteler, et al., 2005; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo, et al., 2004; Ciccocioppo, et al., 2003) e comparar os dados obtidos com álcool com outro reforçador primário, no caso a sacarose.

## MÉTODO

### *Sujeitos*

Foram utilizados ratos machos da cepa *Wistar* ( $n = 16$ ) de aproximadamente 65 dias de idade e peso médio de 482,6 g ( $\pm 42,84$  DP) no início do experimento. Os sujeitos não eram ingênuos e já haviam passado

anteriormente por um treino com odor de laranja e de erva-doce e por um procedimento de extinção, mas não por algum procedimento de reinstalação. Os animais foram alojados em duplas em gaiolas viveiro com dimensões de 38cm X 32cm X 16cm, de poliuretano semi-transparente com grade superior para a alimentação. Eles foram mantidos em um ciclo de 12h luz/escuro, com as luzes sendo acesas às 7:00 da manhã e com água e comida *ad libitum* exceto quando comunicado no procedimento.

### *Drogas e Soluções*

As soluções de etanol foram preparadas por diluição de álcool etílico (99,5% -Synth) em água (volume/volume - v/v). As soluções de sacarose foram preparadas por diluição de açúcar de mesa em água (peso/volume - w/v) e a solução de leite condensado foi preparada pela diluição de leite condensado (Moça) em água (peso/volume - w/v). As diferentes doses de diluição de álcool e sacarose são detalhadas no procedimento.

### *Equipamento e Ambiente Experimental*

Foram usadas caixas de condicionamento operante de metal e acrílico transparente de dimensões 32cm x 25cm x 21cm, separadas por caixas de isolamento acústico. A configuração da caixa operante foi mudada de acordo com a fase do experimento. Na fase de *Auto-administração de etanol e sacarose*, uma proveta de capacidade de 100 ml (escala graduada em 1 ml) foi colocada numa das paredes externas da caixa de forma que seu bico ficasse exposto dentro da caixa. Nos *Treinos, Extinções e Reinstalações* a proveta foi removida e substituída por um bebedouro do tipo pescador (capacidade 0,1 ml). O bebedouro estava localizado no centro da parede a 5 cm do chão. Na mesma parede foram colocadas duas barras de aproximadamente 5 cm de largura, a 8 cm do chão. Uma das barras (barra direita) estava localizada a 3,5 cm do lado direito do bebedouro e a outra (barra esquerda) a 3,5 cm do lado esquerdo.

Não houve controle formal de odores no biotério, porém foi utilizada serragem auto-clavada do mesmo fornecedor e um purificador de ar HEPA Air Purifier, modelo V9070 de fabricação Vicks, para remoção dos odores das caixas experimentais.

Foi utilizado um computador *IBM-PC* para programar e registrar os eventos experimentais.

### *Estímulos*

Foram utilizados ao longo deste estudo reforçadores primários, condicionados e estímulos discriminativos. Os reforçadores primários eram soluções de etanol, soluções de sacarose e água. Os reforçadores condicionados eram: a) estímulo luminoso de 1 W (luz) e 2,0 cm de diâmetro, localizado a 7 cm acima da barra esquerda ( $S^1$ ) e b) estímulo sonoro de 2900 Hz / 65 Db (som), localizado atrás da parede a 6 cm acima da barra esquerda ( $S^2$ ). Os estímulos discriminativos eram: a) essência de laranja composta principalmente por acetato de octilo ( $S^{D1}$ ) e b) essência de erva-doce composta principalmente por anetol ( $S^{D2}$ ).

### *Procedimento*

Após três dias de habituação ao biotério, nenhum animal teve acesso à comida por 24h e eles foram modelados a pressionar a barra esquerda da caixa operante em esquema de reforço contínuo (CRF). Foi utilizado como consequência das respostas de pressão à barra uma solução de 4% (v/v) de leite condensado dissolvido em água. Respostas na barra direita não tinham consequências programadas. Todas as sessões de modelagem foram realizadas uma vez ao dia, seis dias por semana (segunda a sábado).

Em seguida foram realizadas quatro fases experimentais. A primeira fase experimental foi a Auto-administração oral de etanol e sacarose e a segunda, terceira e quarta fases consistiam cada uma em um bloco de treino, extinção e teste de reinstalação. Detalhes de cada fase são mostrados na Figura 1.

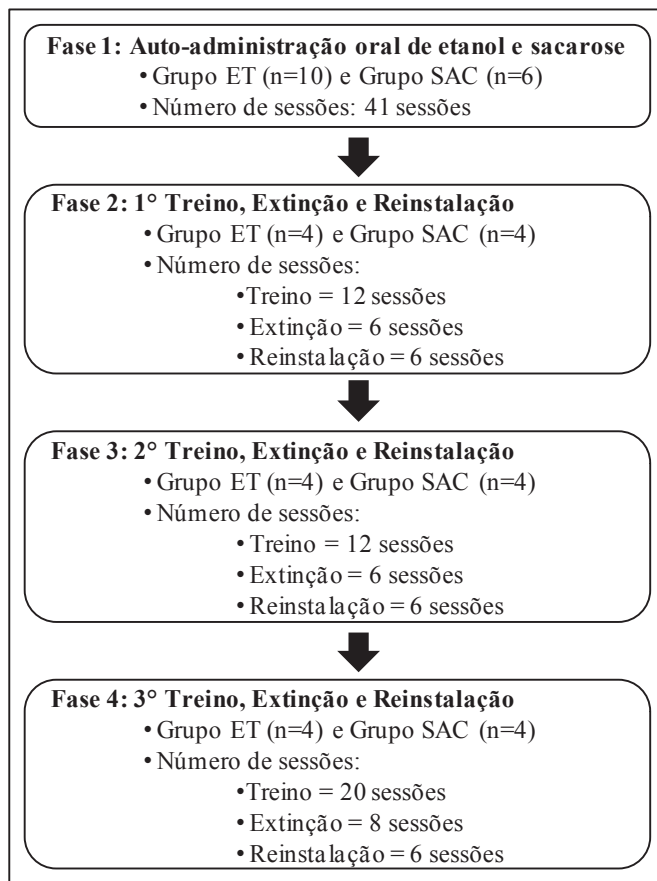


Figura 1. Fluxograma das fases experimentais. O fluxograma mostra o número de sujeitos utilizados, o número de sessões e as sub-divisões de cada fase experimental.

#### Fase 1: Auto-administração oral de etanol e sacarose

Por três dias consecutivos todos os sujeitos foram submetidos a três sessões diárias de 20 min na caixa operante. Nessas sessões, uma solução de 10% de sacarose era apresentada na proveta. Ao longo desses três dias os animais tinham o acesso restrito à comida por apenas 30 min ao dia.

Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos a 41 sessões diárias de 20 min na caixa operante. O grupo ET ( $n=10$ ) foi submetido ao procedimento de *fade in* de etanol

e de *fade out* de sacarose (Samson, Files, Denning, & Marvin, 1998) e o grupo SAC ( $n = 6$ ) foi submetido ao procedimento de *fade in* de sacarose. Os procedimentos de *fade in* e de *fade out* das soluções estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Sessões da fase de Auto-administração oral de etanol e sacarose. A tabela mostra as concentrações de etanol (ET) e de sacarose (SAC) contidos em cada solução apresentada para o grupo ET e para o grupo SAC e a quantidade de sessões realizadas com cada concentração. As concentrações utilizadas estão dispostas na ordem em que foram apresentadas.

Concentração das soluções			Quantidade de Sessões
Grupo ET		Grupo SAC	
ET	SAC	SAC	
2%	10%	2%	2
5%	10%	5%	2
10%	10%	10%	2
10%	5%	10%	3
10%	2%	10%	5
10%	0%	14,5%	2
10%	2%	14,5%	1
10%	0%	14,5%	3
10%	2%	14,5%	5
10%	0%	14,5%	4
10%	2%	14,5%	1
10%	0%	14,5%	1
10%	2%	14,5%	1
10%	0%	14,5%	9

Em todas as sessões desta fase as soluções utilizadas eram colocadas na proveta que era encaixada na caixa operante no início de cada sessão e os sujeitos podiam consumir as soluções livremente durante as sessões experimentais. Ao final das sessões experimentais o consumo da solução contida na proveta era medido.

No final desta fase foram selecionados para continuidade dos procedimentos experimentais os animais do grupo ET que consumiram doses ativas de etanol (0,25 g/kg ou mais de etanol)<sup>3</sup> em pelo menos uma das sessões em que a solução de 10% de etanol (10E) foi apresentada. Tal critério de seleção foi baseado nos dados de pesquisas que indicam que o consumo oral de doses de etanol iguais ou maiores a 0,25 g/kg aumenta a atividade motora e causa mudanças significativas nos circuitos dopaminérgicos do sistema nervoso central em ratos (Williams-Hemby & Porrino, 1997a, 1997b).

3) A dose 0,25 g/kg é equivalente à ingestão de aproximadamente 1,60 ml de uma solução de 10% de etanol por um rato com peso de 500 grs.

*Fase 2: 1º Treino, Extinção e Reinstalação**1º Treino*

O 1º Treino se iniciou no dia seguinte ao término da fase de Auto-administração. Foram realizadas 12 sessões de treino de 30 min de duração na caixa operante com as duas barras disponíveis e com o bebedouro. Pressões na barra direita eram registradas, porém não tinham consequência programada e respostas na barra esquerda davam acesso a 0,1 ml de solução de etanol (Grupo ET), sacarose (Grupo SAC) ou água (ambos os grupos).

Nesta fase foi realizado um treino discriminativo sob esquema múltiplo de reforço (*mult* CRF CRF). Cada um dos dois componentes do esquema múltiplo foi apresentado em sessões distintas. Em um dos componentes, cada resposta de pressão à barra esquerda na presença do cheiro de laranja (estímulo discriminativo 1 – S<sup>D1</sup>) tinha como consequência o acionamento da luz (reforçador condicionado 1 – S<sup>r1</sup>) e a liberação de etanol (grupo ET) ou de sacarose (grupo SAC). No outro componente, cada resposta de pressão à barra esquerda na presença do cheiro de erva-doce (estímulo discriminativo 2 – S<sup>D2</sup>) tinha como consequência o acionamento do som (reforçador condicionado 2 – S<sup>r2</sup>) e a liberação de água (para ambos os grupos). Nos dois componentes o período de apresentação do álcool, da sacarose, da água, da luz e do som foi de 4 s.

Para produzir os odores utilizados como estímulos discriminativos olfativos foram colocadas cinco gotas (aproximadamente 0,1 ml) de extrato com cheiro de laranja ou de erva-doce na serragem da bandeja da caixa experimental antes do início das sessões. Portanto, o cheiro das essências permanecia ao longo de cada sessão experimental.

Foram realizadas ao todo 12 sessões de treino, seis sessões em que a consequência de cada pressão na barra esquerda foi etanol (grupo ET) ou sacarose (grupo SAC) e seis sessões em que a consequência foi água. A ordem de apresentação dos componentes foi sorteada aleatoriamente por programa, resguardado o limite de três apresentações sucessivas do mesmo estímulo.

Ao final das sessões experimentais, além da limpeza habitual das caixas, o purificador de ar era acionado por 2 horas para eliminar vestígios de cheiro na sala e nas caixas. Todas as sessões dessa fase experimental foram realizadas uma vez ao dia com intervalo de 24h entre elas, seis dias por semana.

*1ª Extinção*

Ao término do treino os ratos foram submetidos a seis sessões diárias de extinção da resposta de pressão à barra esquerda, de 30 min cada. Nessas sessões, a serragem foi retirada da bandeja, os estímulos discriminativos não foram apresentados e as respostas de pressão nesta barra não tiveram como consequência a apresentação dos reforçadores condicionados e primários, nem o acionamento do bebedouro.

Finalizadas as sessões de extinção, foi realizada uma nova seleção de sujeitos. Foram excluídos do experimento os animais dos grupos ET e SAC que não apresentaram um número mínimo de 30 respostas em pelo menos uma das sessões do 1º *Treino* quando o etanol ou a sacarose eram apresentados contingentes à resposta de pressão da barra.<sup>4</sup>

4) Trinta resposta é equivalente a 3 ml de solução dispensada pelo bebedouro em uma sessão.

### *1ª Reinstalação*

Nas sessões de reinstalação os estímulos discriminativos e reforçadores condicionados utilizados na fase de Treino foram reintroduzidos, mas as respostas de pressão à barra não acionavam o bebedouro, ou seja, não tinham como consequência a apresentação de etanol, sacarose ou água.

Foram realizadas seis sessões de 30 min de duração cada. Na primeira sessão foram apresentados em conjunto os estímulos  $S^{D1}/S^{r1}$  (odor de laranja/luz) e na segunda sessão foram apresentados em conjunto os estímulos  $S^{D2}/S^{r2}$  (odor de erva-doce/som). A partir da terceira sessão os estímulos passaram a ser apresentados sozinhos e a ordem de apresentação deles foi determinada por sorteio aleatório feito por programa. A ordem de apresentação dos estímulos foi:  $S^{r1}$ ,  $S^{r2}$ ,  $S^{D2}$  e  $S^{D1}$ . Nas sessões que  $S^{r1}$  e  $S^{r2}$  foram apresentados individualmente, a serragem foi retirada da bandeja da caixa experimental.

Após o término da 1ª Reinstalação os animais foram submetidos novamente às três fases experimentais (treino, extinção e teste de reinstalação) com a finalidade de controlar a ordem de apresentação dos estímulos nas sessões de reinstalação. Portanto, foi estabelecida uma nova linha de base das fases de treino e extinção (2º Treino e Extinção) e depois foram realizadas novamente sessões de reinstalação (2ª Reinstalação).

### *Fase 3: 2º Treino, Extinção e Reinstalação*

#### *2º Treino e Extinção*

O procedimento realizado nessa fase foi o mesmo utilizado no 1º Treino e na 1ª Extinção.

#### *2ª Reinstalação*

O procedimento realizado nessa fase foi similar ao da 1ª Reinstalação, porém a ordem de apresentação dos estímulos nas sessões foi modificada para controlar algum possível efeito de ordem. Dessa forma, os estímulos  $S^{D2}/S^{r2}$  foram apresentados em conjunto na primeira sessão e os estímulos  $S^{D1}/S^{r1}$  foram apresentados em conjunto na segunda sessão. A partir da terceira sessão a ordem de apresentação dos estímulos foi sorteada aleatoriamente com a condição de que a ordem de apresentação deles fosse diferente da ordem da 1ª Reinstalação. A ordem de apresentação dos estímulos foi:  $S^{D1}$ ,  $S^{D2}$ ,  $S^{r2}$  e  $S^{r1}$ .

Após o término da 2ª Reinstalação os sujeitos foram submetidos novamente ao bloco de *treino, extinção e reinstalação*, porém com algumas mudanças. A serragem foi colocada em todas as sessões de extinção e de reinstalação e o barulho do bebedouro também foi apresentado em todas essas sessões. Essas mudanças foram realizadas para analisar se, nas fases de reinstalação, a falta do barulho do bebedouro e da serragem funcionou como “dica” de que os reforçadores primários não iriam ser apresentados (i.e observar se o barulho do bebedouro e presença da serragem adquiriram controle sobre a resposta depressão de barra).

### *Fase 4: 3º Treino, Extinção e Reinstalação*

#### *3º Treino*

O procedimento realizado nessa fase foi semelhante ao utilizado no 1º e 2º Treino. A diferença foi que nesse treino foram realizadas 20 sessões no total, dez sessões em que o reforçador foi etanol (grupo ET) ou sacarose (grupo SAC) e dez sessões em que o reforçador foi água. A ordem de apresentação dos componentes

foi sorteada aleatoriamente com o critério de que nenhum componente poderia se repetir por mais de três sessões consecutivas.

### *3ª Extinção*

Ao término do treino os ratos foram submetidos a oito sessões diárias de extinção da resposta de pressão à barra, de 30 min cada. Nessas sessões, a serragem foi mantida na bandeja, os estímulos discriminativos não foram apresentados e as respostas de pressão à barra não tiveram como conseqüências a apresentação dos reforçadores condicionados e primários, porém o bebedouro era acionado a cada resposta de pressão à barra.

### *3ª Reinstalação*

O procedimento dessa fase foi similar ao utilizado na 1ª e na 2ª Reinstalação, com a diferença de que as respostas de pressão à barra acionavam o mecanismo do bebedouro e que serragem sem essência foi colocada na bandeja da caixa experimental em todas as sessões. Na primeira sessão dessa fase os estímulos  $S^{D2}/S^{r2}$  foram apresentados em conjunto e na segunda sessão os estímulos  $S^{D1}/S^{r1}$  foram apresentados em conjunto. A partir da terceira sessão a ordem de apresentação dos estímulos foi sorteada aleatoriamente por programa com a condição de que a ordem de apresentação deles fosse diferente da ordem da 1ª e da 2ª Reinstalação. A ordem de apresentação dos estímulos foi:  $S^{D1}$ ,  $S^{D2}$ ,  $S^{r2}$  e  $S^{r1}$ .

Ao longo de todo o estudo as caixas operantes eram limpas ao de final de cada sessão com uma solução de água e álcool de limpeza a 2%. O intervalo entre uma sessão e outra foi de 24 horas.

### *Análise de dados*

A análise de dados dos treinos e extinções foi realizada através da inspeção visual dos gráficos. Para os testes de reinstalação foi utilizado como critério de reinstalação: a) a frequência de respostas de pressão à barra esquerda nas sessões dessa fase deveria ser no mínimo três vezes maior do que a frequência de respostas nos três últimos dias das fases de extinção; b) a frequência de respostas no teste de reinstalação deveria ser maior que dez respostas.

## **RESULTADOS**

### *Fase 1: Auto-administração oral de etanol e sacarose*

Três sujeitos do grupo ET não atingiram o critério de consumo de etanol nessa fase (consumo de 0,25 g/kg de etanol em pelo menos uma sessão de administração da solução de 10E) e foram excluídos da análise dos resultados, sobrando, portanto, sete sujeitos do grupo ET (SUJ1, SUJ2, SUJ5, SUJ7, SUJ8, SUJ9 e SUJ10). A média de consumo de etanol nas últimas três sessões do restante dos sujeitos foi de  $0,47 \pm 0,20$  g/Kg ( $2,7 \pm 1,14$  ml da solução). A solução de sacarose foi efetiva em manter a resposta de pressão à barra de todos os seis sujeitos do grupo SAC sendo a média do consumo de sacarose nas últimas três sessões de  $13,0 \pm 1,75$  ml.



*Fases 2, 3 e 4: 1º, 2º e 3º Treino, Extinção e Reinstalação**1º, 2º e 3º Treino e Extinção*

Os dados de cinco sujeitos (três do grupo ET e dois do grupo SAC) não foram incluídos na análise de dados dessas fases. Um sujeito do grupo ET (SUJ2) faleceu durante o treino e os outros quatro sujeitos (SUJ5 e SUJ9 do grupo ET e SUJ12 e SUJ 14 do grupo SAC) foram excluídos do experimento, pois eles não atingiram o critério de apresentação de no mínimo 30 respostas em pelo menos uma das sessões de treino quando o etanol ou a sacarose eram apresentados contingentes à pressão da barra esquerda. Portanto, são apresentados os dados de quatro sujeitos do grupo ET (SUJ1, SUJ7, SUJ8 e SUJ10) e quatro sujeitos do grupo SAC (SUJ11, SUJ13, SUJ15 e SUJ16).

Na Figura 2 é mostrado o desempenho dos sujeitos do grupo ET nos 1º, 2º e 3º Treino e Extinção das Fases 2, 3 e 4. Pode-se observar nessa figura que em todos os três treinos realizados a frequência de respostas dos sujeitos foi, em geral, maior nas sessões em que a resposta teve como consequência etanol (grupo ET) ou sacarose (Grupo SAC) do que a frequência de respostas emitidas nas sessões em que a resposta teve água como consequência. Esta diferença foi mais evidente para os sujeitos SUJ1 e SUJ10 do que para os sujeitos SUJ7 e SUJ8. Observa-se ainda na Figura 2 que nas fases de extinção a frequência de respostas dos animais do grupo ET diminuiu consideravelmente a partir da primeira sessão de extinção (em torno de 89% menor em relação à fase de treino) e que esse desempenho manteve-se relativamente estável ao longo dessa condição nas três vezes em que ela foi realizada.

Na Figura 3 é mostrado o desempenho dos sujeitos do grupo SAC nos 1º, 2º e 3º Treino e Extinção das Fases 2, 3 e 4. Nota-se que nas três fases de treino a frequência de respostas de todos os sujeitos foi maior em todas as sessões em que a resposta teve como consequência a solução de sacarose do que nas sessões em que a consequência da resposta foi água. Pode ser observado também que o desempenho de todos os sujeitos foi mais estável no 1º e no 3º Treino do que no 2º Treino, pois nesse último a frequência de respostas mostrou um padrão crescente em três dos quatro sujeitos. Nas três fases de extinção todos os animais mostraram diminuição rápida e estável da frequência de respostas (em torno de 97% em relação à fase de treino).

*1ª, 2ª e 3ª Reinstalação*

Na Figura 4 é mostrado o desempenho dos sujeitos do grupo ET na 1ª, 2ª e 3ª Reinstalação nas Fases 2, 3 e 4 do experimento. Os dados representam o número de respostas emitidas na barra esquerda pelos sujeitos em cada uma das seis sessões de cada teste de reinstalação. Os critérios utilizados para considerar que a frequência de respostas em uma determinada sessão era condizente com a reinstalação da resposta de pressão à barra são detalhados no método. Nota-se nesta figura que quando a luz ( $S^1$ ) foi apresentada, tanto em conjunto com o odor de laranja ( $S^{D1}$ ) quanto sozinha, houve reinstalação da resposta de pressionar a barra de todos os sujeitos. Entretanto, quando o odor de laranja foi apresentado sozinho, apenas os sujeitos SUJ1 e SUJ10 atingiram o critério de reinstalação e cada um deles em apenas um dos três testes de reinstalação realizados.

Observa-se também na Figura 4 que os estímulos associados à água não controlaram a reinstalação da resposta de pressão à barra dos sujeitos. Uma exceção foi o desempenho do sujeito SUJ7 no primeiro teste de reinstalação, cuja frequência de respostas atingiu o critério de reinstalação quando os estímulos odor de erva-doce e som foram apresentados em conjunto ( $S^{D2}/S^2$ ).

Pode-se observar também que o número de respostas dos sujeitos e a consistência em que houve reinstalação quando os estímulos associados ao álcool eram apresentados, foram, em geral, diminuindo ao longo dos testes de reinstalação.

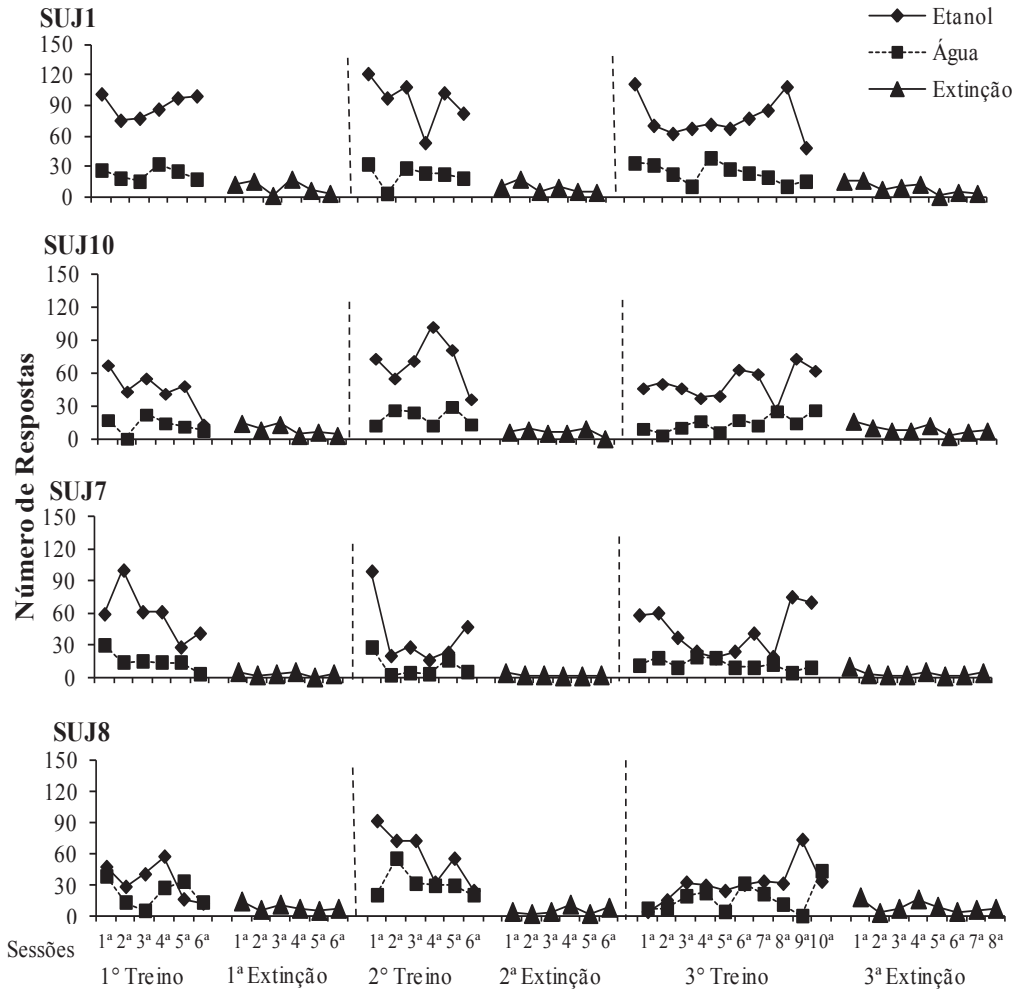


Figura 2. Desempenho dos sujeitos do grupo ET nos 1º, 2º e 3º Treino e Extinção das Fases 2, 3 e 4. Os dados representam o número de respostas de pressão à barra esquerda de cada sujeito em cada sessão de treino e extinção de cada fase. Nos treinos pressões à barra na presença do odor de laranja eram seguidas de um estímulo luminoso e da liberação de etanol; e pressões à barra na presença do odor de erva-doce eram seguidas de um estímulo sonoro e da liberação de água. Nas sessões de extinção, os estímulos olfativos, luminosos, auditivos, o etanol e a água não estavam presentes.

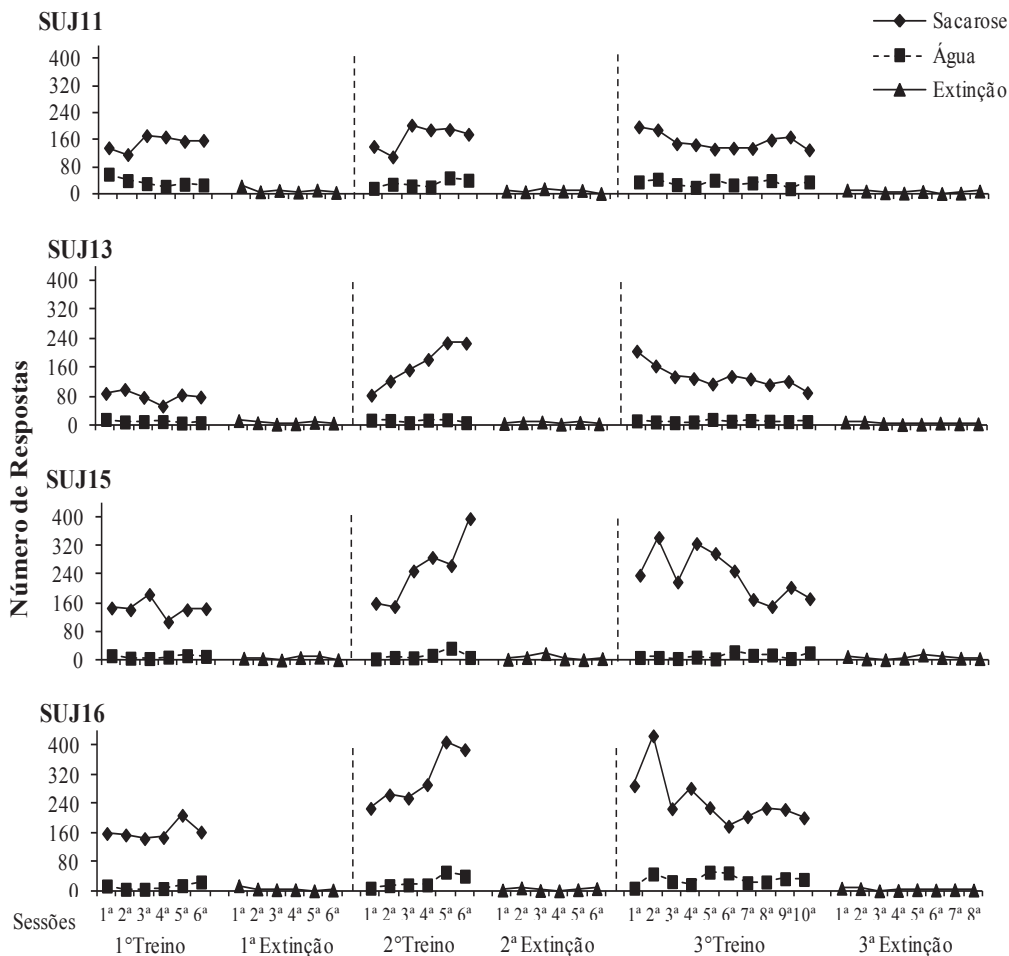


Figura 3. Desempenho dos sujeitos do grupo SAC nos 1º, 2º e 3º Treino e Extinção das Fases 2, 3 e 4. Os dados representam o número de respostas de pressão à barra esquerda de cada sujeito em cada sessão de treino e extinção de cada fase. Nos treinos pressões à barra na presença do odor de laranja eram seguidas de um estímulo luminoso e da liberação de sacarose; e pressões à barra na presença do odor de erva-doce eram seguidas de um estímulo sonoro e da liberação de água. Nas sessões de extinção, os estímulos olfativos, luminosos, auditivos, a sacarose e a água não estavam presentes.

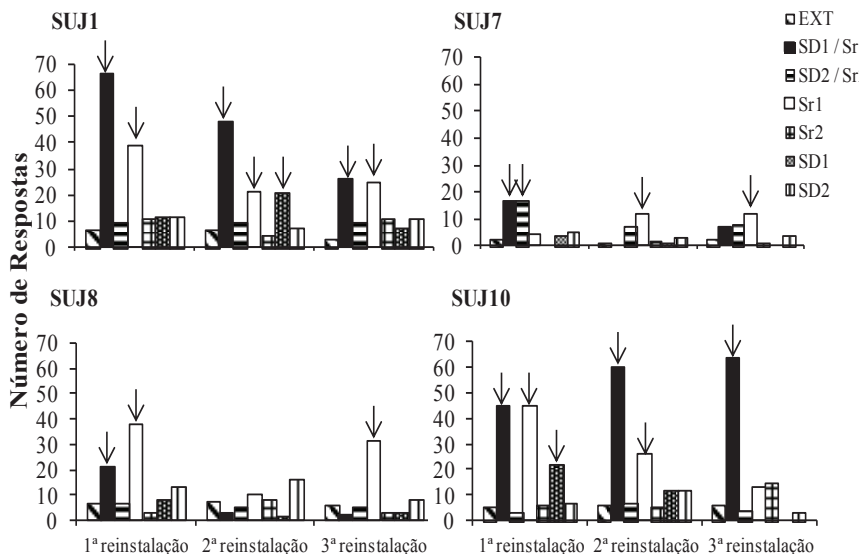


Figura 4. Desempenho dos sujeitos do grupo ET nos 1º, 2º e 3º testes de reinstalação das Fases 2, 3 e 4. Os dados representam a média da frequência de respostas das últimas três sessões da fase de extinção (EXT) e o número de respostas dos sujeitos do grupo ET em cada uma das sessões dos testes de reinstalação:  $S^{D1}/S^{r1}$  (estímulo discriminativo1/reforçador condicionado1),  $S^{D2}/S^{r2}$  (estímulo discriminativo2/reforçador condicionado2),  $S^{r1}$  (reforçador condicionado1),  $S^{r2}$  (reforçador condicionado2),  $S^{D1}$  (estímulo discriminativo1) e  $S^{D2}$  (estímulo discriminativo2). As setas indicam as sessões onde foi considerado que houve reinstalação da resposta de pressão à barra.

Na Figura 5, é apresentado o número de respostas dos sujeitos do grupo SAC na 1ª, 2ª e 3ª Reinstalação das Fases 2, 3 e 4 do experimento. Nota-se na figura que a apresentação da luz ( $S^{r1}$ ), tanto em conjunto com o odor de laranja ( $S^{D1}$ ) quanto sozinha, reinstalou a resposta de pressionar à barra da maioria dos sujeitos. Pode-se ainda observar na Figura 5 que a frequência de respostas emitida pelos sujeitos não atingiu o critério de reinstalação nas sessões em que o odor de laranja ( $S^{D1}$ ) foi apresentado sozinho.

Na Figura 5 é também evidente que o número de respostas dos sujeitos do grupo SAC diminuiu ao longo dos testes de reinstalação, principalmente no último teste de reinstalação realizado, onde os resultados não foram tão consistentes quanto nos dois primeiros testes de reinstalação.

Em resumo, a despeito da variabilidade entre-sujeitos obtida na fase de reinstalação é possível observar um padrão no desempenho da maioria dos sujeitos de ambos os grupos (ET e SAC): a frequência de respostas observada quando  $S^{r1}$  foi apresentado (tanto em conjunto com  $S^{D1}$  quanto sozinho) foi maior do que a frequência de respostas obtida quando os outros estímulos foram apresentados.

Comparando as Figuras 4 e 5 nota-se também que nas sessões em que  $S^{r1}$  foi contingente à resposta de pressão à barra, a frequência de respostas do grupo ET foi, em geral, maior do que a do grupo SAC. Esse achado é relevante quando é considerado que na fase de treino a frequência de respostas dos sujeitos do grupo ET foi até três vezes menor do que a dos sujeitos do grupo SAC (Figuras 2 e 3).

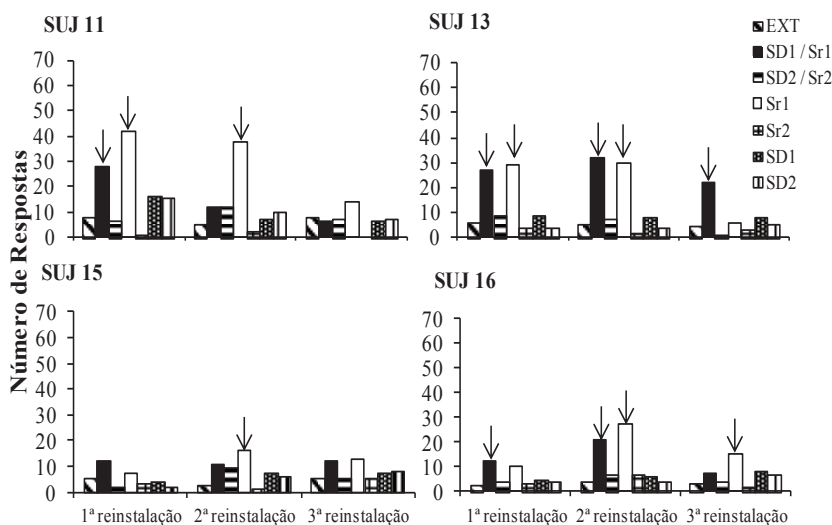


Figura 5. Desempenho dos sujeitos do grupo SAC nos 1º, 2º e 3º testes de reinstalação das Fases 2, 3 e 4. Os dados representam a média da frequência de respostas das últimas três sessões da fase de extinção (EXT) e o número de respostas dos sujeitos do grupo SAC em cada uma das sessões dos testes de reinstalação:  $S^{D1}/S^{r1}$  (estímulo discriminativo1/reforçador condicionado1),  $S^{D2}/S^{r2}$  (estímulo discriminativo2/reforçador condicionado2),  $S^{r1}$  (reforçador condicionado1),  $S^{r2}$  (reforçador condicionado2),  $S^{D1}$  (estímulo discriminativo1) e  $S^{D2}$  (estímulo discriminativo2). As setas indicam as sessões onde foi considerado que houve reinstalação da resposta de pressão à barra.

Por último, foi observado que a frequência de respostas emitidas na barra controle (barra direita) manteve-se entre 0 e 13 respostas por sessão ao longo de todo o experimento (dados não apresentados), para todos os sujeitos.

## DISCUSSÃO

Um grande número de estudos tem utilizado o modelo animal de recaída ao uso de drogas *cue-induced* para examinar o papel dos estímulos ambientais na recaída ao uso de drogas após um período sem o uso da droga (Bachteler & cols, 2005; Ciccocioppo & cols, 2004, Ciccocioppo & cols, 2003; Ciccocioppo & cols, 2002; Ciccocioppo, Angeletti, & cols, 2001; Ciccocioppo, Sanna & cols, 2001). Esses estudos têm mostrado consistentemente que a re-apresentação de estímulos ambientais (estímulos discriminativos e reforçadores condicionados) associados aos efeitos do álcool ocasionam respostas de auto-administração dessa droga. Esse resultado é considerado como evidência de que os estímulos ambientais associados com respostas reforçadas por drogas podem levar à recaída ao uso de drogas. Porém, um problema encontrado nesses estudos é que eles não diferenciam a função dos estímulos discriminativos da função dos reforçadores condicionados

na aquisição e manutenção do comportamento de auto-administrar da droga (Fuchs, Lasseter, Ramirez & Xie, 2009).

No presente estudo o controle exercido pelos estímulos discriminativos e reforçadores condicionados sobre a reinstalação de respostas reforçadas por etanol foi analisado separadamente. Especificamente, os resultados indicaram que a apresentação apenas do reforçador condicionado ( $S^r$ ) associado à disponibilidade de etanol controlou a resposta de pressão à barra nos testes de reinstalação realizados. Por outro lado, a apresentação apenas do estímulo discriminativo ( $S^{D1}$ ) associado à disponibilidade de etanol não controlou a resposta de pressão à barra nestes testes. Portanto, é possível presumir que a reinstalação da resposta observada nas sessões de reinstalação em que os dois estímulos foram apresentados em conjunto, tanto neste estudo, quanto na literatura apontada, é função do controle sobre a resposta adquirido pelo reforçador condicionado e não pelo estímulo discriminativo.

É importante salientar que os resultados obtidos neste estudo não foram função da ordem de apresentação dos estímulos nas sessões de reinstalação, uma vez que essa ordem foi sorteada aleatoriamente e mudada em todos os três testes de reinstalação realizados. De fato, independente da ordem em que a luz ( $S^r$ ) foi apresentada a frequência de respostas na sua presença foi maior do que na presença dos outros estímulos sozinhos.

Em resumo, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que o treino realizado foi efetivo em estabelecer a luz ( $S^r$ ) como reforçador condicionado da resposta reforçada por etanol, mas falhou em estabelecer o odor de laranja ( $S^{D1}$ ) como estímulo discriminativo dessa resposta, diferente do presumido pela literatura (Bachteler, et al., 2005).

Também pode ser observado no presente estudo que o modelo de recaída ao uso de drogas *cue-induced* pode ser reproduzido com outros reforçadores primários que não drogas de abuso. Neste estudo, além de etanol, foi utilizada uma solução de sacarose como reforçador da resposta de pressão à barra e, semelhante aos dados obtidos com o etanol, os resultados mostraram que o reforçador condicionado ( $S^r$ ), mas não o estímulo discriminativo ( $S^{D1}$ ), adquiriu controle sobre a resposta de pressão à barra.

Deste modo, os dados obtidos neste estudo levam a uma questão interessante: porque o treino realizado não foi efetivo em estabelecer o odor de laranja como estímulo discriminativo? Algumas hipóteses podem ser levantadas acerca desta questão.

Primeiro, o esquema de reforço contínuo (CRF) utilizado neste experimento, e nos experimentos que utilizam o modelo animal de recaída ao uso de drogas *cue-induced* (Bachteler, et al., 2005; Ciccocioppo, Angeletti & Weiss, 2001; Ciccocioppo, Economidou, et al, 2004, Ciccocioppo, Lin, Martin-Fardon & Weiss, 2003; Ciccocioppo, Martin-Fardon, & Weiss, 2002; Ciccocioppo, et al., 2001; Williams & Schimmel, 2008), pode ter dificultado o estabelecimento da função discriminativas dos odores. Segundo Jenkins (1965) o esquema CRF é uma contingência de reforço que facilita o controle pela consequência o que pode interferir nos treinos discriminativos; é por esse motivo que seu uso em treinos discriminativos é frequentemente evitado, pois não favorece que o sujeito atente para o estímulo antecedente à resposta. Assim, é possível propor que o treino realizado nesta pesquisa favoreceu o controle da resposta pelos estímulos que eram consequência desta (i.e reforçador condicionado e primário) e não dos estímulos que a antecediam (i.e estímulos discriminativos).

Uma segunda hipótese, também relacionada com o treino discriminativo, é relativa ao procedimento de treino intra-sessão e entre-sessões utilizado neste experimento e em outros que usaram o modelo de recaída *cue-induced*. O procedimento tradicionalmente empregado para estabelecer discriminações simples consiste em submeter os sujeitos a um esquema múltiplo de reforço no qual a alternância entre os esquemas programados acontece em uma mesma sessão experimental (i.e. os estímulos discriminativos são apresentados na mesma sessão experimental, alternadamente). Por outro lado, no procedimento de treino discriminativo do modelo de recaída ao uso de drogas *cue-induced* os dois estímulos discriminativos utilizados são

apresentados em sessões distintas. Assim, poderia ser argumentado que a apresentação em sessões separadas e, conseqüentemente, a longa duração da apresentação do S<sup>D</sup> em cada sessão (que fica presente durante toda a sessão), é um fator que dificulta o estabelecimento do estímulo programado como discriminativo. Entretanto, Katner, Magalong & Weiss (1999) e Katner & Weiss (1999) obtiveram controle discriminativo de odores da resposta de pressão à barra de ratos submetidos a um procedimento de treino similar ao usado neste experimento, mas sem a manipulação experimental de reforçadores condicionados.

Uma vez que a principal diferença entre os experimentos de Katner et al. (1999) e de Katner e Weiss (1999) e os dois experimentos deste estudo foi a apresentação de reforçadores condicionados (S<sup>r1</sup> e S<sup>r2</sup>) ao longo do treino discriminativo, é possível supor que é essa a principal variável que deve ser considerada para explicar os resultados obtidos no experimento aqui relatado. Em outras palavras, a apresentação do reforçador condicionado durante o treino pode ter interferido no estabelecimento do estímulo olfativo como discriminativo.

Uma terceira hipótese, relacionada com a afirmação acima colocada, é que o desempenho observado nas sessões de reinstalação tenha sido decorrente do treino ter estabelecido uma cadeia de respostas que tinha como reforçador final o etanol, sacarose ou água. Nessa cadeia, as respostas de pressão à barra eram seguidas da apresentação do reforçador condicionado, que pode ter adquirido a função de estímulo discriminativo para respostas de aproximação do bebedouro, cuja consequência era a liberação do etanol ou sacarose. Desta forma, o estímulo olfativo, por ficar presente durante toda a sessão experimental, pode não ter sido um evento ambiental relevante da cadeia. Por sua vez, o reforçador condicionado foi parte essencial da cadeia: as respostas de aproximação ao bebedouro foram reforçadas por etanol ou sacarose apenas na presença do reforçador condicionado.

Por último, deve ser apontado que os resultados observados na terceira reinstalação sugerem que a ausência do barulho do bebedouro e da serragem nas sessões da primeira e segunda extinção e reinstalação não foram variáveis determinantes do desempenho dos sujeitos nessas sessões.

Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo replicaram os dados obtidos com o modelo animal de recaída ao uso de drogas *cue-induced*, pois os estímulos associados ao etanol, mas não os associados à água reinstalaram a resposta de pressão à barra. Ainda, mostraram que o treino foi efetivo em estabelecer um estímulo neutro (luz) como reforçador condicionado da resposta de pressão à barra, mas falhou em estabelecer outro estímulo neutro (odor) como discriminativo dessa mesma resposta. Portanto, sugerem que a reinstalação da resposta de pressão à barra, tipicamente observada na fase de teste do modelo de recaída ao uso de drogas *cue-induced*, pode ser função do reforçador condicionado e não do controle de estímulos estabelecido no treino. Este último achado é possivelmente o de maior contribuição para a análise funcional desse modelo animal, pois indica a necessidade da realização de novos experimentos que manipulem o esquema de reforço, o treino discriminativo e a modalidade de estímulos utilizada para clarificar a função dos estímulos discriminativos e reforçadores condicionados na recaída do abuso de drogas de ação central. Tal empreitada é fundamental para o desenvolvimento de um modelo animal válido de reinstalação do uso de drogas.

## REFERÊNCIAS

- Associação Americana de Psiquiatria (1994/2002). *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais-IV*. Trad. D. Batista. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Bachteler, D., Economidou, D., Danysz, W., Ciccocioppo, R., & Spanagel, R. (2005). The effects of acamprosate and noremexane on cue-induced reinstatement of ethanol-seeking behavior in rat. *Neuropharmacology*, 30(6), 1104-1110.

- Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas/Universidade Federal de São Paulo (Cebrid) (2005). *Bebidas Alcoólicas*. Disponível: [http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/alcool\\_.htm](http://www.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/alcool_.htm). Acessado em 30/10/2009.
- Ciccocioppo, R., Angeletti, S., & Weiss, F. (2001). Long-lasting resistance to extinction of response reinstatement induced by ethanol-related stimuli: role of genetic ethanol preference. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 25(10), 1414-1419.
- Ciccocioppo, R., Economidou, D., Fedeli, A., Angeletti, S., Weiss, F., Heilig, M., et al. (2004). Attenuation of ethanol self-administration and of conditioned reinstatement of alcohol-seeking behaviour by the antiopioid peptide nociceptin/orphanin FQ in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 172(2), 170-178.
- Ciccocioppo, R., Lin, D., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2003). Reinstatement of ethanol-seeking behavior by drug cues following single versus multiple ethanol intoxication in the rat: effects of naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)*, 168(1-2), 208-215.
- Ciccocioppo, R., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2002). Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. *Neuropsychopharmacology*, 27(3), 391-399.
- Ciccocioppo, R., Sanna, P. P., & Weiss, F. (2001). Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1976-1981.
- Epstein, D. H., Preston, K. L., Stewart, J., & Shaham, Y. (2006). Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berl)*, 189(1), 1-16.
- Fuchs, R. A., Lasseter, H. C., Ramirez, D. R. & Xie, X. (2009). Relapse to drug seeking following prolonged abstinence: the role of environmental stimuli. *Drug Discovery Today: Disease Models* 5(4), 251-258.
- Jenkins, H. M. (1965). Measurement of stimulus control during discriminative operant conditioning. *Psychological Bulletin*, 64(5), 365-176.
- Katner, S. N., Magalong, J. G., & Weiss, F. (1999). Reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated discriminative stimuli after prolonged extinction in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 20(5), 471-479.
- Katner, S. N., & Weiss, F. (1999). Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*, 23(11), 1751-1760.



## RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar o controle de estímulos sobre as respostas de recaída ao uso de drogas avaliado pelo modelo animal *cue-induced*. Dois grupos de ratos foram expostos a um treino discriminativo. Respostas de pressão à barra na presença de um odor de laranja ( $S^{D1}$ ) tinham como consequência um estímulo luminoso ( $S^{r1}$ ) e liberação de etanol (grupo ET) ou sacarose (grupo SAC). Respostas na presença de um odor de erva-doce ( $S^{D2}$ ) tinham como consequência um estímulo sonoro ( $S^{r2}$ ) e liberação de água. Posteriormente, as respostas de pressão à barra foram extintas. Depois,  $S^{Ds}$  e  $S^{rs}$  foram reintroduzidos, mas as respostas de pressão à barra não foram seguidas por etanol, sacarose ou água. Inicialmente,  $S^{Ds}$  e  $S^{rs}$  foram apresentados na mesma sessão e em seguida cada estímulo foi apresentado em sessões separadas. Esse procedimento foi realizado três vezes para controlar possíveis efeitos da ordem de apresentação. Os resultados mostraram que apenas a apresentação de  $S^{r1}$ , em conjunto com  $S^{D1}$  ou sozinho, foi efetiva em reinstalar as respostas de pressão à barra em ambos os grupos. Os resultados sugerem que o modelo *cue-induced* pode não ser apropriado para o estudo do controle de estímulos discriminativos sobre o uso de drogas.

Palavras-chave: *cue-induced*, modelo animal, controle de estímulos, recaída, dependência.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to analyze the stimulus control established by the animal model of drug relapse “*cue-induced*”. Two groups of rats, ET and SAC, were exposed to a discrimination procedure. Lever press responses in the presence of orange odor ( $S^{D1}$ ) were followed by a light stimulus ( $S^{r1}$ ) and ethanol or sucrose release (ET or SAC groups, respectively), while responses in the presence of anise odor ( $S^{D2}$ ) were followed by a sonorous stimulus ( $S^{r2}$ ) and water release. Next, rats were placed on extinction conditions during which ethanol, sucrose and water, as well as the corresponding stimuli, were withdrawn. After extinction,  $S^{Ds}$  and  $S^{rs}$  were reintroduced, but lever press responses were not followed by ethanol, sucrose or water. In the first two sessions  $S^{D1}$  and  $S^{r1}$  or  $S^{D2}$  and  $S^{r2}$  were presented. In the remaining sessions, each stimulus was presented alone. This procedure was performed three times in order to control any effect of the order of stimuli presentation. The results showed that  $S^{r1}$  presentation, alone or in the same session than  $S^{D1}$ , was effective in reinstating lever pressure responses for both groups. The results suggest that the *cue-induced* procedure may not be the most suitable one to study discriminative control over drug self-administration.

Key-words: *cue-induced*, animal model, stimulus control, relapse, addiction