Universidade de São Paulo

Instituto de Psicologia

Ana Martins Torres Bernardes

**Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do
tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente
enriquecido e isolados.**

São Paulo

2014

Ana Martins Torres Bernardes

**Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do
tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente
enriquecido e isolados.**

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia como
parte dos requisitos para obtenção do grau de
Doutora em Psicologia – Área de concentração
Neurociência e Comportamento.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares

São Paulo

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Bernardes, Ana Martins Torres.

Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do
tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente
enriquecido e isolados / Ana Martins Torres Bernardes; orientadora
Miriam Garcia Mijares. -- São Paulo, 2014.

106 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia.
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Álcool 2. Auto-administração 3. Enriquecimento ambiental 4.
Ondansetrona 5. Escolha I. Título.

BF199.5

Ana Martins Torres Bernardes

Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente enriquecido e isolados.

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Psicologia – Área de concentração Neurociência e Comportamento.

Apresentada e aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

(Nome, titulação, instituição e Assinatura)

(Nome, titulação, instituição e Assinatura)

(Nome, titulação, instituição e Assinatura)

(Nome, titulação, instituição e Assinatura)

(Nome, titulação, instituição e Assinatura)

Para Jorge.

Agradecimentos

Agradeço a Miriam pela orientação, pela amizade, pelo apoio, pela paciência, por ter me ensinado tanto nesses vários anos. Miriam, sem você esse trabalho nunca teria existido, pois foi você que colocou em mim a semente do que ele viria a se tornar e permitiu que ele continuasse, mesmo quando isso parecia impossível. Obrigada por ser tão ousada.

Agradeço a Teresa pelo início de tudo.

Agradeço aos membros da banca de qualificação Fábio e Luciano pela tranquilidade e pelas discussões e idéias que possibilitaram a continuidade desse trabalho.

Obrigada, Roberto, pelos comentários preciosos sobre o meu mestrado que ajudaram a construir o doutorado. Espero manter a minha petulância.

Agradeço Marie-Odile por ser uma excelente professora e nos auxiliar tanto nas análises hormonais.

Obrigada, Felipe, por ser meu companheiro. Pela nossa vida, nosso filho. Obrigada pela ajuda nas revisões desse trabalho, por agüentar minhas inseguranças e nervosismo, pelas horas de conversa, mas, acima de tudo, obrigada por dividir sua vida comigo.

Agradeço a Marina pela disponibilidade e ajuda inestimável nesse trabalho, sem ela não teria sido possível a sua conclusão.

Agradeço a todos os companheiros de laboratório por rirem comigo, de mim e por me fazerem rir, pelas conversas no meio da tarde, discussões e apoio. Fernanda, Liane, William, Yulla, Hernando, Andeson, Talita, Fernanda Pezzato, Diana, Larissa e Raquel.

Agradeço aos estagiários que participaram desse trabalho de tantas formas diferentes, Rafael, Tamires, Talita, Marina.

Agradeço Wilton pela amizade de tantos anos, pelo ombro amigo nas horas felizes e difíceis, por me agüentar.

Obrigada Yas, amiga antiga, por todos esses anos, pelo cuidado, pelas longas conversas, pela diversão e apoio. Por ser uma pessoa incrível, absurdamente inteligente e interessante.

Obrigada mãe, obrigada pai.

Obrigada Lia e Tais, minhas irmãs queridas, lindas e insuportáveis por serem do jeito que são, por sermos tão diferentes e tão parecidas. Obrigada pelo cuidado e compreensão durante a realização desse trabalho.

Obrigada a todos os professores que me ensinaram tanto em todos esses anos, o que possibilitou que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao Instituto de Psicologia da USP e todos os seus funcionários pela estrutura e pela longa história.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Our understanding of addiction...

...our understanding of drugs is built on many assumptions.

One of the biggest assumptions is that drugs are seductively addictive...

...with drug addiction caused by mere exposure to these bewitching substances.

The researchers watched on as the caged rats self-injected powerful psychoactive drugs.

Dominated by their habits, some of the rats would choose drug injections in preference to food and water.

Killing themselves through neglect.

The implications were bleak and worrying.

It seemed that drugs were capable of ruinous harm to individuals' self-control...

...and if drugs were available to people as freely as they were to the lab rats...

...mass-addiction and social crisis would be the certain result.

In the 1950s and 60s, the scientific 'proof' of chemical addiction came from rat experiments.

The rats were surgically connected to self-injection apparatus...

...put into...

...isolated cages...

...and taught to self-administer drugs by pressing a lever inside the cage.

He wondered how much insight into human addiction could be gathered by studying rats.

Professor Bruce Alexander thought differently.

He wondered how much insight could be gathered by studying rats in solitary confinement.

Descended from wild Norway Rats, albino lab rats remain curious, gregarious social creatures...

...so the sensory deprivation of the classical drug experiments must have been akin to torture.

Alexander wondered if he too would retreat into a drugged haze, if locked in a box and given no other option.

In 1977, Prof. Alexander assembled a team of Simon Fraser University researchers.

Bruce Alexander

Barry Beyerstein

Robert Coombs

Patricia Hadaway

The team decided to repeat the classical rat-drug studies...

...but with some crucial differences.

Their experiment would test the power of drug addiction using morphine...

...a close cousin to the notoriously 'irresistible', 'life-destroying' heroin.

The team ventured bravely into the dark domain of addiction, wondering what they would find.

The researchers took over a large room within the university and began preparing a carefully-controlled experiment.

In one part of the room they placed an array of standard wire mesh cages (18 x 25 x 18cm).

The metal cage walls would isolate these rats, preventing them from touching or seeing each other.

In the other part of the room, the researchers constructed a large plywood enclosure.

Measuring 8.8m², the enclosure had over 200x the area of the standard laboratory cages.

The researchers painted the walls with scenes of woodlands, and natural environments.

They covered the floor with fragrant cedar shavings for the rats to nest in...

...and scattered boxes and cans for the rats to hide and play in.

Importantly, the researchers gave the rats other rats to play, fight, mate, and interact with.

Satisfied they had created a rodent paradise...

...they named the enclosure 'Rat Park'...

...and began experimenting on the rats.

Stuart McMillen- Rat Park - 2003

Stuart McMillen
All things.

Copyright 2013 Stuart McMillen. For more comics visit:
stuartmcmillen.com
ratpark.com

Bernardes, AMT

Análise do comportamento de escolha por etanol e efeitos do tratamento com Ondansetrona de ratos criados em ambiente enriquecido e isolados.

Resumo

O presente trabalho visou a estudar a relação entre o ambiente em que ratos se desenvolvem e a auto-administração de etanol (ET) na idade adulta. Usualmente, a pesquisa comportamental com animais em laboratório utiliza sujeitos mantidos isolados em caixas (I). Uma das espécies mais usadas é o rato, um animal social que em habitat natural vive em colônias. Tem sido proposto que a baixa disponibilidade de reforçadores alternativos é um dos fatores determinantes no abuso de drogas. O presente estudo visou comparar tratamentos comportamentais, i.e., Reforçadores concorrentes, e tratamentos farmacológicos, i.e., ondansetrona, no consumo de ET nos ratos criados nos diferentes ambientes. Para tal, ratos Wistar machos foram criados em I ou em ambiente enriquecido (AE) e o comportamento de auto-administração do ET foi medido pelo desempenho sob um esquema concorrente VR-VR no qual uma alternativa dispensava uma solução de ET e a outra uma solução isocalórica ao ET. No primeiro experimento, a influência de reforçadores concorrentes no consumo de ET foi avaliada utilizando um delineamento experimental do tipo ABAB, com água ou solução isocalórica (maltodextrina- MALTO 14,8%) como concorrentes ao consumo de ET, alternadamente. A fim de estimar se diferenças nos níveis de ansiedade incondicionada eram responsáveis por diferenças no consumo de ET foi realizado um teste no labirinto em cruz elevada. Não houve diferença significativa entre os grupos. A fim de estudar os efeitos da ondansetrona, um bloqueador dos receptores de 5-HT₃, que vem sendo relatado na literatura como eficaz em reduzir o consumo de ET em dependentes, mas apenas no subgrupo de início precoce, os animais criados em diferentes ambientes foram submetidos a um modelo concorrente de consumo. Primeiramente a introdução do ET foi realizada ao final da adolescência dos sujeitos, e a escolha por ET ou o concorrente foram avaliados em diferentes fases: concorrente isocalórico ou água reproduzindo o primeiro experimento, e houve diferenças significativas entre os grupos. Solução de MALTO 1% foi utilizada como concorrente ao ET para o teste da droga. Foram testadas duas doses da droga: 0,1mg/kg e 0,4 mg/kg. Foram conduzidos testes sem o uso de restrição alimentar e em abstinência de ET, em que apenas a sacarina 0,25% era apresentada. Paralelamente, foram realizadas coletas de fezes dos animais, durante as diversas fases do experimento a fim de estimar os níveis fecais do hormônio associado ao estresse corticosterona. Os sujeitos do grupo I consumiram e responderam significativamente mais pelo ET. A ondansetrona alterou o consumo de ET dos sujeitos apenas quando concorrente à MALTO 1%, de maneiras diferentes para os diversos sujeitos. A criação nos diferentes ambientes influencia a excreção de metabolitos fecais de corticosterona em função das fases experimentais.

Bernardes, AMT

Analysis of ethanol choice behavior and effects of ondansetron treatment on rats reared in enriched environment and isolation

Abstract

The aim of the present work was to study the relation between the environment in which rats develop and the self-administration of ethanol (ET) during their adult life. Usually, behavior research using animals in laboratory is done with subjects kept in isolated (I) boxes. Rats are one of the most commonly used species and are social animals when in their natural habitat, living in colonies. It is proposed that low availability of alternative reinforcers is one of the key factors for drug abuse. The present work compared the effects of behavior treatments (i.e. concurrent reinforcers) and pharmacological treatments (i.e. ondansetron) in ET consumption by rats raised in two different types of environment. Male Wistar rats were reared in I or enriched environments (EE) and the behavior of ET self-administration was measured on a operant self-administration procedure using a VR-VR concurring schedule in which an alternative delivered an ET solution and the other, an isocaloric solution (maltodextrin - MALTO 14,8%). In the first experiment, the influence of concurrent reinforcers over the consumption of ET was measured using an ABAB design, with water or the isocaloric solution as alternative reinforcers each at a time. With the purpose of estimating if different levels of unconditioned anxiety were responsible for different levels of ET consumption, tests were conducted in an elevated plus maze. There were no significant differences between groups EE and I. On Experiment 2 the effects of ondansetron, an antagonist of 5-HT₃ receptor that has been shown to reduce ET consumption on dependent human subjects, but only for early onset dependents, was evaluated. ET was introduced when subjects were in their late teens. The ET consumption and choice behavior of rats reared in EE or I were evaluated in a concurrent schedule. Isocaloric solution or water were delivered, reproducing Experiment 1 and significant differences emerged between groups. MALTO1% solution or water were then used as concurrents reinforcers to ET for the test using the drug. Two drug doses were tested: 0,1mg/kg and 0,4 mg/kg. Also, there were assessments made without alimentary restrictions and in ET abstinence: with sacarin 0,25% (VEI) as a reinforcer instead of ET solution. Feces samples were collected during the various phases of the experiment in order to estimate the fecal metabolites of the stress related hormone corticosteron. Subjects from group I consumed and responded significantly more for ET. Ondansetron altered ET consumption and choice behavior among subjects only when ET was delivered concurrently to MALTO 1%. Rearing in different environments influences the excretion of corticosteron fecal metabolites depending on the experimental phase. The presence of a concurrent reinforcer altered ET driven behavior and rearing in different environments (EE and I) influences ET consumption, ET choice behavior and corticosterone excretion.

Sumário

Introdução	01
Método	32
Resultados	44
Discussão	63
Conclusões	77
Bibliografia	79

O presente trabalho trata-se de uma continuidade da dissertação de mestrado *Efeito enriquecimento ambiental na auto-administração oral de álcool em ratos* (Bernarde,2008).

Uma das principais estratégias de produção de conhecimento em Análise do Comportamento é a experimentação sob condições controladas de laboratório. O controle sobre a história de aprendizagem supõe que as respostas observadas na situação experimental são apenas função das variáveis manipuladas pelo pesquisador ao longo do experimento. Em outras palavras, boa parte do repertório comportamental do sujeito deve ser adquirida dentro da situação experimental. Para tanto, a história de aprendizagem do animal não humano fora do contexto experimental é rigorosamente controlada pela padronização dos cuidados, alimentação, ciclo claro-escuro, temperatura e, especialmente, do ambiente de criação e manutenção.

Usualmente, o ambiente de manutenção de ratos de laboratório consiste em uma caixa-viveiro, com paredes lisas homogêneas ou com grade. Em uma das paredes, ou no teto da caixa, são dispostos a água e o alimento. O rato é colocado em isolamento nesse ambiente logo após o desmame e permanece nele ao longo de todo o experimento. Sob esses padrões de criação e manutenção, são reduzidas as interações do animal com o ambiente fora do contexto experimental e, portanto, a emissão de comportamentos diferentes ao estudado é limitada.

As estratégias de controle mencionadas têm contribuído para a produção de um volumoso corpo de conhecimentos sobre os princípios básicos que regem a aquisição ontogenética de novos repertórios comportamentais. Entretanto, como será exposto a seguir, sua generalidade para predizer o comportamento de organismos inseridos em ambientes ricos em estimulação física e social tem sido contestada por dados oriundos de experimentos sobre enriquecimento ambiental de animais de laboratório.

Enriquecimento Ambiental

Durante a década de 60, o psicólogo Mark R. Rosenzweig pôs-se a estudar como a criação em diferentes tipos de ambiente influenciaria a morfologia e a fisiologia cerebral de ratos. Para tanto, montou situações experimentais em que ratos eram criados em grupo, em ambientes que ofereciam oportunidade para a emissão de diversos comportamentos, o que ficou conhecido como ambiente enriquecido (AE). Esses animais eram comparados com os que viviam em situação padrão de laboratório, isolados em pequenas caixas contendo o mínimo necessário à sobrevivência - água e comida-, ou seja, em um ambiente “pobre”. Esse ambiente é frequentemente denominado de ambiente isolado ou ambiente “I” (Rosenzweig & Bennett, 1969). Rosenzweig, Bennett e cols. (1969) observaram que o tipo de ambiente afetava a morfologia e a bioquímica cerebral. Animais criados no AE mostraram maior peso, volume e atividade enzimática, especialmente de acetilcolinesterase e colinesterase, em diversas estruturas cerebrais, mas especialmente significativas no córtex occipital quando comparados a animais criados no “I”. Pesquisas posteriores também verificaram que o AE estava associado a maior número de conexões neuronais, maior espessura do córtex occipital, aumento no tamanho dos contatos sinápticos, aumento no número de espinhos nos dendritos, maior ramificação dos dendritos e melhor desempenho em testes de aprendizagem (Møllgaard, Diamond, Bennett, Rosenzweig, Lindner, 1971; Pham, Winblad, Granholm, & Mohammed, 2002; Rosenzweig & Bennett, 1996). Esses efeitos foram observados em animais de diferentes idades quando expostos ao enriquecimento ambiental, e são muito similares às mudanças observadas em animais submetidos a diversos tipos de treinamento (para uma revisão, ver Markham & Greenough, 2004). Aparentemente, a cascata de respostas neuroquímicas desencadeada

pelo enriquecimento ambiental é similar à produzida pelo treinamento formal, levando a mudanças no sistema nervoso central. Esse efeito é observado mesmo em animais com o sistema nervoso lesionado, os quais apresentam melhor recuperação se mantidos em ambientes enriquecidos em relação aos que são mantidos em isolamento (Dahlqvist et al., 2003).

O isolamento de animais sociais também pode ser considerado um fator significativo de estresse moderado e de longa duração (Souza, 2002). Por isso, Moncek e seu grupo (Moncek, Duncko, Johansson, & Jezova, 2004) resolveram estudar os efeitos da criação de ratos em AE sobre os sistemas relacionados ao estresse, comparando esses animais a animais criados em grupo, porém sem enriquecimento ambiental. Demonstraram que animais criados em grupo em AE quando comparados a animais criados apenas em grupo, apresentam nível basal de corticosteróides mais elevado e também um aumento no tamanho das glândulas adrenais. Essas medidas são medidas fisiológicas clássicas de estresse, usado neste texto como variável dependente, como proposto por Selye (1974), e indicariam que os animais do AE apresentam uma maior reação desse tipo que os apenas agrupados, sugerindo um componente aversivo na estimulação do AE.

Na visão do próprio Selye, no entanto, nem todo o estresse é prejudicial, pois um certo tônus dessas respostas fisiológicas é adaptativo e seria necessário para o funcionamento ótimo do organismo. Esse conjunto de respostas fisiológicas denominado estresse seria prejudicial apenas quando a sua duração ou intensidade levam ao aparecimento de outras respostas fisiológicas, como baixa do hormônio testosterona, aumento e hiperatividade do córtex das adrenais e diminuição do timo e dos nódulos linfáticos, o que perturbaria o correto funcionamento do organismo,

levando, inclusive, a uma baixa no sistema imunológico e causando sofrimento, o que ele chama de “*distress*”.

Saltar de pára-quedas, encontrar um amigo querido, tomar uma vacina ou fazer exercícios físicos causam aumento dos níveis de corticóides e de tamanho das adrenais, sem por isso causar prejuízo ao organismo. São situações que demandam adaptação do organismo, que desta forma eliciam respostas a fim de que essa adaptação aconteça. No entanto, se o organismo não consegue se adaptar a essa demanda, tamanha sua intensidade ou duração, ele começa a apresentar sofrimento (*distress*) (Selye, 1974).

Esse sofrimento também é acompanhado por perturbações no comportamento, como perda de apetite, perda de força muscular e anedonia (Selye, 1974). Os animais criados em AE, comparados aos criados também em grupo, porém em ambiente pobre, não apresentam essas alterações que indicam o “*distress*”. A criação em isolamento social, inclusive, traz dificuldades à recuperação de ferimentos e doenças e esses animais freqüentemente apresentam alterações importantes no comportamento, como aumento da atividade motora (Ehlers, Walker, Pian, Roth, & Slawecki, 2007) e aumento da estereotipia de movimentos (Kalueff, Wheaton, & Murphy, 2007). Na verdade, os animais criados em AE apresentam uma resposta mais rápida de habituação ao estresse agudo de manipulação. Ao longo de várias manipulações repetidas seus picos de corticosteróides baixam mais rapidamente, o que significa que os animais criados em AE se habituam mais rapidamente a estímulos, mesmo que sejam inicialmente aversivos, em comparação com os animais criados em grupo, mas sem brinquedos, esconderijos etc. (Moncek et al., 2004). Os níveis de adrenalina e de noradrenalina, hormônios de reação ao perigo, dos animais criados em AE são significativamente mais baixos em resposta ao estímulo manipulação do que os níveis dos animais apenas agrupados (Moncek et al., 2004). Outros experimentos também mostraram diferentes

respostas fisiológicas a diversos estressores entre ratos criados em AE e ratos criados sem enriquecimento (Roy, Belzung, Delarue, & Chapillon, 2001). Assim, pode-se dizer que ratos criados em AE apresentam o tônus ótimo desses hormônios relacionados a respostas frente a estímulos aversivos, sem os efeitos deletérios associados a seu excesso.

O enriquecimento ambiental, enquanto oportunidade de o animal exibir um repertório variado de comportamentos, é essencial para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central. As alterações comportamentais e fisiológicas observadas em animais criados em isolamento são indicativas de mau funcionamento do organismo e limitam a capacidade deste de se adaptar às exigências do ambiente (Olsson & Dahlborn, 2002). Nesse sentido, a validade dos dados de pesquisas que usam sujeitos na condição padrão de laboratório pode ser limitada. Além disso, animais criados em ambientes enriquecidos estariam menos sujeitos às alterações comportamentais e fisiológicas causadas por pequenas variações que ocorrem entre biotérios, laboratórios e experimentadores (Garner, 2005; Wurbel, 2001).

A esse respeito, Rosenzweig & Bennett (1996) afirmam: “Uma experiência suficientemente rica parece ser necessária para o completo desenvolvimento das características cerebrais específicas da espécie e do seu potencial comportamental.” (pg. 57). Portanto, animais criados em um ambiente rico em estímulos, com uma maior disponibilidade de reforçadores, são diferentes de animais criados em ambientes pobres, limitados na disponibilidade de estímulos ambientais.

Catania (1999) considera que reforçadores são simplificados quando tratados meramente como estímulos. Reforçadores só são reforçadores dependendo da relação que é estabelecida entre eles e as respostas que os produzem, e por isso só podem ser definidos em função dessas respostas. Segundo o autor, reforçadores são eventos que

quando consequentes a uma resposta aumentam a probabilidade futura de ocorrência de respostas similares, ou seja, aumentam a probabilidade de ocorrência de uma classe de respostas. “Reforçadores são relativos e suas propriedades importantes são baseadas nas respostas às quais eles criam oportunidade de ocorrência” (p. 100). Constitui-se, assim, uma relação que “inclui o responder, suas consequências e as mudanças no comportamento que se segue” (p.101). A limitação ambiental usada na criação padrão em isolamento reduz imensamente as oportunidades que o animal tem de operar sobre seu ambiente, de alterá-lo e, portanto, de adaptar-se a ele. Do ponto de vista comportamental, trata-se de uma situação de baixa disponibilidade de reforçadores, prolongada e incontrolável.

Animais criados em AE têm a possibilidade de realizar diversas atividades que animais criados nas caixas padrão de laboratório em isolamento não têm. Em outras palavras, têm disponibilidade de um maior número de estímulos em seu ambiente em comparação com os ratos isolados. Como a diferente disponibilidade de estímulos, em especial de estímulos reforçadores, afeta o comportamento operante?

Uma forma interessante de abordar essa questão deriva de estudos sobre o comportamento de escolha. No início da década de 60, Richard Herrnstein estudou como os organismos distribuem suas respostas entre alternativas diferentes. Ele utilizou pombos em esquema concorrente de intervalo variável e mediu como as repostas dos pombos eram distribuídas entre as alternativas de acordo com a taxa de reforçamento em cada alternativa. Os resultados desse experimento mostraram que a frequência relativa de respostas em uma alternativa era proporcional à taxa relativa de reforço dessa alternativa. Fundamentado nesse resultado, o autor propôs que essa relação entre taxa de respostas e taxa de reforços é um princípio geral do comportamento de escolha e o formalizou em uma equação denominada “Lei da Igualação” (Herrnstein, 1961).

Posteriormente, as diversas dimensões dos reforçadores que influenciavam em como as respostas eram distribuídas foram aglutinadas sob o conceito de valor reforçador (Baum e Rachlin, 1969). A lei de igualação reformulada sob esse conceito propõe que a taxa relativa de respostas em uma alternativa é proporcional ao valor reforçador relativo da alternativa. No caso de duas alternativas a lei de igualação seria expressa pela seguinte equação: $R_1/(R_1+R_2) = F_1/(F_1+F_2) = V_1/(V_1+V_2)$, sendo 1 e 2 as alternativas, R a taxa de resposta, F a taxa de reforço e V o valor reforçador. Existem diversas derivações posteriores dessas equações (ver Baum, 1974 por exemplo), mas para o presente trabalho as equações básicas são suficientes.

Seguindo o raciocínio presente nas equações pode-se perceber que quando há mais de uma opção o valor de cada uma delas é diminuído em comparação ao caso em que existe apenas uma. Quando há alternativas de resposta, não se faz apenas aquilo que tem maior probabilidade de ser reforçado, mas as respostas são distribuídas entre as várias possibilidades na mesma proporção em que respostas são reforçadas em cada uma das alternativas. O comportamento é distribuído entre as várias opções de atividade, dependendo dos eventos reforçadores contingentes a cada uma. No entanto, se não há opções, ou se as alternativas possuem um valor reforçador muito baixo, observa-se um comportamento que um observador leigo chamaria de estereotipado ou compulsivo: um rato que não tem muitas opções do que fazer acaba fazendo muitas vezes as poucas coisas que pode.

A lei da igualação tem sido utilizada para o entendimento de várias das chamadas psicopatologias, inclusive a dependência de drogas psicoativas (Herrnstein & Prelec, 1992). Por exemplo, Heyman (2009) observa a dependência como uma disordem de escolha. Dependentes escolhem usar a droga a cada momento, e, não realizar outras atividades concorrentes, pois localmente o valor reforçador da droga é

maior do que o de suas atividades concorrentes. Como as consequências aversivas do uso da droga ocorrem de modo temporalmente distante têm um menor poder de controlar o comportamento. Apenas quando analisado numa perspectiva global, de longo prazo é que a escolha de usar a droga faz com que se perca outros reforçadores, e que o total de reforços obtidos seja menor do que aquele que se obteria não usando a droga (ou usando pouco) e realizando as outras atividades.

É de especial interesse para essa pesquisa é o trabalho de Heyman, Gendel & Goodman (1999), que demonstraram que mudanças na exigência da tarefa afetam diferencialmente o valor reforçador de etanol (ET) quando apresentado concorrentemente ao suplemento calórico maltodextrina (MALTO- Polycose™ da Bayer). Nesse experimento, ratos privados de comida eram treinados sob esquema concorrente de razão variável 5 (VR) em que pressões em uma das barras eram reforçadas por ET 10% adoçado com sacarina e pressões na outra barra por MALTO 14,8%. Nessas concentrações, as soluções de ET e MALTO são isocalóricas. Posteriormente, a exigência do número respostas (aumento no esquema de VR) para a MALTO foi aumentada progressivamente de 5 para 7,5 ; 10, 15 e 30, enquanto a exigência para o ET foi mantida constante em 5; depois, essas condições foram invertidas. Os resultados mostraram que quando a exigência na barra que dispensava o ET foi aumentada, a taxa de respostas aumentou, enquanto a taxa não mudou quando a exigência na barra associada com a MALTO foi aumentada. Na análise econômica que o autor faz desses dados, a exigência no número de respostas para a obtenção de um reforço pode ser considerada como o preço desse reforço, e a relação entre as alterações relativas no consumo (taxa de respostas) em função do preço (número de respostas exigidas) é chamada de elasticidade da demanda. Se a mudança relativa no consumo é menor do que a mudança relativa no preço do produto (no caso de um reforço), ou seja,

se com o aumento de exigência do esquema o número de respostas aumenta ou se mantém, a demanda é chamada de inelástica. Se a mudança relativa no consumo é maior do que a mudança relativa do preço, ou seja, se com o aumento de exigência o número de respostas e o consumo diminuem, essa demanda é chamada de elástica. O autor concluiu que o consumo de ET por parte dos ratos foi inelástico, enquanto o da MALTO foi elástico. Em outras palavras, aumentos no “preço” do ET foram acompanhados de aumentos do número de respostas para obter esse reforçador, de modo que o consumo dessa substância manteve-se estável. Entretanto, quando foi o “preço” da MALTO que mudou, os animais não aumentaram a taxa de respostas, o que levou a uma diminuição do consumo. Nesse sentido, pode-se afirmar que o ET mostrou maior controle sobre o comportamento do que a MALTO.

O procedimento experimental de Heyman et al (1999) é bastante interessante por se tratar de um modelo de escolha, aproximando-se mais da situação na qual ocorre o abuso da droga, em que o organismo está exposto a diferentes reforçadores. Possibilita também que seja medido como esses reforçadores influenciam de forma diferencial o comportamento. Ainda, o uso de esquemas de VR possibilita uma alta taxa de respostas e um maior controle do próprio animal sobre consumo da droga, pois a taxa de respostas está diretamente relacionada à taxa de reforço.

Usando um delineamento experimental similar ao de Heyman et al (1999), experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que a criação de animais em diferentes ambientes, com diferentes disponibilidades de reforçadores, altera o comportamento mantido por ET (Bernardes, 2008). Nesse experimento, o ET foi introduzido por *fade in/fade out* de sacarose, culminando em uma solução de ET 10% adoçada com sacarina 0,25%. O consumo do ET foi medido em esquema operante concorrente de razão variável. A exigência em VR foi aumentada a cada 5 sessões,

progressivamente, de 5 para 7,5 ; 10, 15 e 30, primeiro para a alternativa isocalórica, uma solução de maltodextrina a 14,8%, e depois para a solução de ET. Os resultados desse experimento mostraram que ratos criados em isolamento consumiram mais ET do que animais criados em AE, indicando que essa droga apresentou maior valor reforçador para os primeiros. Por outro lado, a introdução de reforçadores concorrentes (MALTO) alterou o consumo de ET dos animais criados em isolamento sem alterar, no entanto, o consumo dos animais criados em AE. A criação nos diferentes ambientes não alterou a elasticidade da demanda por ET: esta foi igualmente inelástica para ambos os grupos. A diferença de ambientes, porém, alterou a elasticidade da demanda por MALTO. Os animais do grupo I, apesar de consumirem mais MALTO, apresentaram uma demanda mais elástica desse consumo em relação aos do grupo AE. A queda de consumo de MALTO foi significativamente mais acentuada no grupo I do que no grupo AE. Ainda, as respostas de pressão à barra do grupo I foram deslocadas para a barra associada com o ET: aumentos na exigência por MALTO levaram a um aumento na taxa de respostas por ET nesse grupo, o que não ocorreu com o grupo AE. É interessante notar que esse fenômeno guarda alguma semelhança com a ocorrência das chamadas recaídas que são observadas em seres humanos. Ao ocorrerem aumentos na exigência de um reforçador concorrente retoma-se, por exemplo, o consumo de ET.

O DSM-IV define abuso e dependência como padrões mal adaptativos de uso de substância, levando a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, ocorrendo em qualquer momento no mesmo período de 12 meses. Para o critério de dependência é preciso que ocorram pelo menos 3 dos seguintes critérios: tolerância, abstinência, que o uso da droga continue apesar de tentativas de parar, de perdas em atividades sociais, ocupacionais ou recreativas e/ou da percepção que esse uso causa ou exacerba problemas físicos e psicológicos. Que os comportamentos associados à droga

ocorram em alta frequência e a substância seja consumida em doses ou por períodos maiores que o planejado. Já o abuso é caracterizado pelo uso da substância mesmo que isso traga consequências negativas, porém não atendendo aos critérios para ser considerada dependência (APA, 1994). É importante notar que a caracterização tanto de dependência quanto de abuso pelos critérios do DSM é feita somente com base em uma análise topográfica do comportamento, sem consideram possíveis diferenças funcionais no uso da droga. Alguns sujeitos podem usar ET para aliviar estresse proveniente de situações sociais, funcionalmente o ET nesse caso seria um reforçador negativo, enquanto outros podem usar a droga pelos seus efeitos eufóricos, funcionalmente um reforçador positivo nesse caso. É bastante provável que diferenças em termos de função do uso da droga sejam fundamentais para o tratamento, e no entanto essas diferenças costumam ser ignoradas na literatura sobre dependência.

As drogas de abuso podem funcionar como reforçadores positivos tanto para animais quanto para humanos (McKim, 2006), na medida em que a entrada de droga no organismo contingente a uma resposta aumenta a probabilidade futura dessa resposta. Animais não humanos e humanos comportam-se em função de obter drogas como consequência: vão ao bar ou a uma boca de fumo, pressionam uma barra, trabalham, roubam, pedem dinheiro emprestado, injetam, cheiram, bebem, exibem uma complexa cadeia de respostas que, no final, leva à entrada da droga no organismo.

O uso, abuso e a dependência de drogas ocorrem em ambientes nos quais existem vários outros reforçadores disponíveis, em que a cada momento escolhe-se entre buscar e usar drogas ou exibir outros comportamentos diversos. No caso da dependência, esses comportamentos relacionados à droga ocorrem em alta frequência, têm alta probabilidade de ocorrer em relação a outros comportamentos.

É preciso lembrar que drogas são reforçadores com algumas características especiais. Atuam muito mais diretamente na circuitaria cerebral do reforço do que outros reforçadores. Por agirem diretamente sobre o sistema nervoso central, seus efeitos não dependem essencialmente das vias sensoriais, por isso sua ação é muito rápida e intensa, o que as torna reforçadores muito poderosos. Além disso, não produzem, em sua maioria, saciedade, diferentemente de outros reforçadores primários como comida e água.

De um ponto de vista evolutivo, algo que provoca uma reação tão intensa no organismo precisa ser considerado como algo muito importante, assim sendo, estímulos associados tornam-se muito salientes por condicionamento respondente (Everitt & Robbins, 2005). Desta forma, as drogas alteram o sistema nervoso e o comportamento de forma que os estímulos associados a ela tornam-se mais capazes de controlar o comportamento do que outros estímulos do ambiente (Kalivas & Volkow, 2005; Robinson & Berridge, 2001).

No entanto, a dependência de drogas produz muitas conseqüências que normalmente seriam consideradas aversivas e que na maioria dos casos funcionariam como punidores, mas que, no caso, não atuam assim, não são eficazes para reduzir a freqüência dos comportamentos de obtenção das drogas (Heyman, 1996). Mas por que as perdas da família, do emprego, dos amigos, da saúde, não funcionariam como punidores?

Em primeiro lugar, porque esses estímulos aversivos não são tão imediatos quanto os efeitos reforçadores da droga: são temporalmente mais distantes do comportamento que é conseqüenciado por eles e, portanto, têm sua capacidade de atuar sobre eles diminuída. Além disso, são também comportamentalmente mais distantes: ter todos os comportamentos para obter a droga em freqüência alta impede o indivíduo de

alocar seu tempo a outras coisas, como dar atenção ao trabalho, à família e aos amigos. Os efeitos da droga levam o indivíduo a agir de formas que afastam as pessoas, ou o incapacitam de fazer coisas necessárias, como trabalhar bem. As drogas também têm um efeito dissociativo, ligado ao controle por estímulos: aquilo que é aprendido sob seu efeito é mais dificilmente recordado em outra situação (McKim, 2006). Assim sendo, as consequências aversivas, muitas vezes relacionadas ao comportamento de outros, ocorrem após uma longa cadeia de respostas, que incluem reforçadores diversos, e por isso perdem seu poder de punir o comportamento.

As relações familiares, de trabalho e de amizade tornam-se menos satisfatórias e mudanças no SNC, induzidas pelo uso da droga, como inibição dos receptores do tipo D2 e aumento da transmissão mediada por receptores do tipo D1, fazem com que o sistema dopaminérgico que faz parte do circuito do reforço responda adequadamente apenas a estímulos, antecedentes e consequentes, associados à droga. Estes sistemas tornam-se menos sensíveis a outros estímulos, diminuindo o potencial de controle desses estímulos sobre o comportamento (Garcia-Mijares & Silva, 2006; Kalivas & Volkow, 2005).

Porém, a dependência de drogas não pode ser vista apenas pelas características especiais das substâncias como reforçadores. Ela não se deve apenas a características intrínsecas das drogas. Se assim fosse, toda experiência com drogas levaria inexoravelmente à espiral descendente da dependência, e não é isso que se observa: muitas pessoas consomem drogas, exibindo até um padrão de consumo abusivo, sem por isso tornarem-se dependentes. Muitos usuários, inclusive, descontinuam o uso da droga espontaneamente.

Especialmente interessante é o estudo conduzido durante a década de 70 com soldados da guerra do Vietnã por Robins e colegas (Robins, Helzer, & Davis, 1975;

Wish, Robins, Hesselbrock, & Helzer, 1979). O estudo mostra que, durante a guerra, 35% dos soldados dos Estados Unidos da América usaram heroína. A droga era de fácil acesso, barata e seu uso pouco reprimido. Aproximadamente 20% dos usuários tornaram-se dependentes, e seus exames deram positivo para o uso de heroína, mesmo que eles tenham sido avisados com antecedência da realização dos testes. Mas, ao retornarem aos EUA, onde tinham suas famílias, encontraram maior dificuldade para conseguir a heroína, droga mais cara e não aceita socialmente. A maioria dos soldados abandonou o consumo. Apenas uma pequena porcentagem manteve o uso por mais de 3 anos, mesmo entre aqueles que continuaram usando heroína quando voltaram para casa. Aproximadamente apenas 3% dos veteranos haviam usado heroína regularmente em algum período nos dois anos anteriores e apenas um em cada seis deles havia procurado tratamento.

Muitos estudos apontam os chamados fatores de risco para a dependência, que incluem fatores genéticos, história de vida, disponibilidade, facilidade de acesso e preço das drogas, além de condições como o isolamento social (Hartnoll, 1991). A dependência de drogas é um fenômeno multifatorial e deve ser estudado como tal, não apenas como decorrência do poder reforçador de uma ou outra droga. Deve ser estudada sob as mesmas leis que regulam o comportamento dito “normal”, e há de se considerar que diversos fatores atuam de forma a aumentar a probabilidade de que comportamentos para obter e usar a droga ocorram em alta frequência. Considerando-se que a disponibilidade de reforçadores alternativos altera o valor reforçador dos outros reforçadores, a oferta de reforçadores no AE, bem como a disponibilidade de reforçadores diretamente concorrentes à droga, poderiam alterar a frequência dos comportamentos contingenciados pela droga e seu o valor reforçador.

Ambiente Enriquecido e Drogas

Vários estudos foram realizados visando a esclarecer que influência a criação em AE exerce sobre o consumo de drogas quando comparada à criação de animais em isolamento. Bruce Alexander e colegas demonstraram que animais criados em isolamento consumiam oralmente significativamente mais uma solução de morfina do que ratos criados em AE (Alexander, Coombs, & Hadaway, 1978; Hadaway, Alexander, Coombs, & Beyerstein, 1979). Os pesquisadores também demonstraram a preferência por estimulantes (anfetamina) e barbitúricos (barbital) em animais isolados em comparação com os criados em AE (Zimmerberg & Brett, 1992). Em ambos os casos foram utilizadas medidas individuais coletadas dentro do ambiente em que os animais viviam. Ratos criados em isolamento, inclusive, generalizam para doses mais baixas de cocaína e anfetamina do que ratos criados em ambiente enriquecido, o que indica uma maior sensibilidade desses animais em isolamento às propriedades de estímulo dessas substâncias (Fowler et al., 1993).

Em relação ao álcool, porém, os dados da literatura são contraditórios. Apesar de ser uma das drogas mais antigas conhecidas pelo homem e de estar presente de alguma forma em quase todas as culturas humanas, a ciência ainda não foi capaz de desvendar todos os seus mistérios

Na literatura sobre a influência da criação de animais em ambientes enriquecidos ou em isolamento sobre consumo de etanol encontram-se resultados muito diversos: aumento de consumo por animais criados em AE, aumento de consumo por animais em isolamento e também dados que não mostram alteração no consumo. Porém, não existe uma padronização dos experimentos, nem quanto ao tipo de ambiente natural, nem quanto aos procedimentos de introdução do etanol. Encontra-se também uma grande variação nas cepas de ratos utilizadas, nas idades de introdução e tempos de

permanência nos diferentes ambientes, além de diferentes tempos de exposição e dosagens de etanol. A maior congruência dos diversos estudos é o uso do modelo de escolha de duas garrafas, um contendo etanol e a outra contendo água ou alguma outra solução. Dada a vasta literatura a respeito, selecionamos alguns experimentos representativos da questão colocada pelo problema em foco: comportamento em relação ao etanol em função do ambiente de criação.

Durante o final da década de 1970 e ao longo dos anos 1980, o psicólogo Gaylord Ellison (1987) conduziu uma série de experimentos sobre o consumo de etanol por animais criados em ambientes seminaturalísticos, equivalentes ao que aqui está sendo chamado de AE. Os estudos de Ellison são muito interessantes, pois, além de medir o consumo de etanol, ele também fez uso de observações etológicas dos comportamentos exibidos pelos animais na colônia. Em todos os seus experimentos, ele utilizou como sujeitos ratos Long-Evans machos privados de alimento e com livre acesso a ET 10% e água.

Num primeiro experimento, Ellison comparou um grupo de animais vivendo em AE a um grupo vivendo em isolamento (I) medindo o consumo dentro do próprio ambiente. No AE havia um sistema de fotocélulas que, ao serem interrompidas quando um rato acessava o bebedouro, acionavam uma câmera que registrava qual dos sujeitos bebia o quê e por quanto tempo. Ellison considerou que essa não era uma medida precisa o suficiente para aferir o consumo individual, mas suficiente para mostrar que as médias de consumo dos grupos AE e I diferiam, sendo que o grupo I apresentava um consumo maior de água e álcool do que o grupo AE.

Ao observar e registrar outros comportamentos e medidas dos animais no AE, Ellison percebeu que eles apresentavam uma maior variabilidade quando comparados com os animais do grupo I, inclusive quanto à frequência de visitas ao bebedouro de

ET. A fim de obter uma medida mais precisa dessas diferenças de consumo individuais, ele realizou um novo experimento, no qual os animais continuavam a ser criados nos ambientes distintos - com livre acesso a água e ET 10%. Porém, depois de 7 meses os animais do AE eram retirados de seu ambiente, colocados em caixas individuais e seu consumo de ET e água era medido por 7 dias. Então, foi obtido o resultado inverso: nesses dias foi observado que os animais AE passaram a consumir mais ET do que os ratos do grupo I que haviam permanecido em seu ambiente normal durante o período. Mas Ellison também observou que havia diferenças importantes no padrão de consumo dentro do grupo dos ratos da colônia: alguns bebiam muito e quase que exclusivamente ET, outros bebiam muito pouco ET ou até apenas água. Isso não ocorria com os animais do grupo I, que apresentavam menor variação e bebiam bastante água também.

Ellison, então, correlacionou essas diferenças com as outras medidas comportamentais observadas e percebeu uma correlação com o status social do animal na colônia: os animais com status mais alto, maior dominância, consumiam muito pouco ET, enquanto os grandes bebedores eram aqueles que tinham o status mais baixo dentro da colônia. Num terceiro experimento, ele observou mais cuidadosamente esses dois subgrupos dentro do AE, os grandes bebedores e os abstêmios, e notou que os grandes bebedores consumiam também bastante ET no que seria equivalente ao período da manhã para os humanos, enquanto os outros animais não o faziam. Esses ratos também apresentavam um menor consumo de comida e eram menos ativos. Além disso, apresentavam menos comportamentos violentos e um aumento na frequência do *grooming* social quando comparados aos animais que consumiam pouco ou nenhum ET. Ellison propôs que esses grandes bebedores que

aparecem dentro do AE representam um modelo do alcoolismo em humanos, e que várias de suas diferenças são comparáveis às observadas em dependentes de álcool.

É importante notar, entretanto, que esse resultado foi obtido após uma mudança radical de ambiente para os ratos criados em AE. Eles foram retirados de seu ambiente, separados de seus companheiros e privados de seus brinquedos, enquanto os ratos criados isolados permaneceram na mesma condição. Esse isolamento, essa mudança radical de ambiente no período do teste, pode ter interferido no resultado. Essa variável, não considerada por Ellison, pode ter influído no consumo da droga, levando à diferença encontrada.

Um grupo de psicólogos canadenses chefiado por Gary Rockman também realizou diversos experimentos relacionando enriquecimento ambiental e consumo de ET (Rockman & Gibson, 1992; Rockman, Gibson, & Benarroch, 1989; Rockman, Hall, Markert, & Glavin, 1988). Esses pesquisadores criaram ratos Sprague-Dawley a partir dos 21 dias de idade em grupos de 25 machos e 5 fêmeas (números não relatados e deduzidos pela densidade populacional e tamanho do ambiente descritos no artigo), que eram trocadas por novas fêmeas a cada 18 dias para evitar o nascimento de ninhadas na colônia. O ambiente continha duas rodas de exercício, canos de metal de diversos comprimentos, tubos de plexiglass e uma plataforma de metal com escada de metal, objetos esses que eram rearranjados periodicamente. Os animais tinham acesso constante a comida e água. Outro grupo de ratos machos Sprague-Dawley foi criado em isolamento, também com comida e água *ad lib*.

Após 90 dias, os animais de cada grupo foram subdivididos em dois grupos. Metade dos machos da colônia foi isolada e mantida assim pelo resto do experimento. A outra metade passou a ser isolada durante 16 horas do dia para a mensuração do consumo de ET, sendo recolocada na colônia nas 8 horas restantes. Metade dos

animais criados em isolamento era mantida em suas caixas habituais, enquanto a outra metade permanecia nesse arranjo durante as 16 horas em que o álcool estava disponível e nas outras 8 horas do dia era colocada na colônia. Durante 32 dias, todos os animais tinham acesso ao ET por essas 16 horas a cada dia em caixas isoladas durante o período da noite e comida e água *ad lib*. Assim, foram estabelecidos quatro grupos, que foram denominados, respectivamente, enriquecido, enriquecido/isolado, isolado e isolado/enriquecido. Os autores relatam que 6 dos animais morreram ou foram sacrificados por doença durante o experimento, porém não relatam em que fase isso ocorreu ou de que grupo faziam parte. No entanto, a configuração final de sujeitos em cada grupo foi a seguinte: enriquecido, n=9; enriquecido/isolado, n=10; isolado, n=9; isolado/enriquecido, n=6. Esse número de sujeitos totalizaria 40 sujeitos iniciando o experimento, com 15% de mortalidade em animais com menos de 5 meses de idade.

Foram testadas várias concentrações de ET (3, 5, 7 e 9 %), mas Rockman encontrou diferenças significativas apenas entre o grupo enriquecido/isolado e o grupo isolado/enriquecido na concentração de 5%. Verificou também que os animais do grupo enriquecido apenas consumiam significativamente mais ET do que todos os outros grupos na concentração de 9%. A partir disso, Rockman e seus colegas afirmam que animais criados em ambiente enriquecido consomem mais ET do que animais criados em isolamento, e que isso não se deve ao período em que os animais são retirados da colônia para a medida desse consumo.

Em primeiro lugar, o ambiente de colônia usado pelo grupo não segue as especificações para ser considerado tal como definido neste texto um AE. Para isso seriam necessários objetos manipuláveis de diversos tamanhos, formas e materiais, rearranjados e trocados regularmente (Fernandez-Teruel et al., 2002). Além disso,

um AE deve contar com espaços para que os animais exibam seus comportamentos naturais. É preciso haver áreas para a criação de ninhos, esconderijos e áreas separadas para que os animais possam fugir de brigas. Preferencialmente, a comida deve ser escondida dentro do ambiente, para que os ratos tenham a oportunidade de forragear, procurar e esconder as pelotas de ração (Baumans, 2005; Hutchinson, Avery, & Vandewoude, 2005). Nada disso existia no ambiente utilizado por Rockman e colegas.

Ellison (1987) relata que a introdução de fêmeas nesse ambiente espacialmente restrito, em vez de ser um fator de enriquecimento, aumenta muito a agressividade dos animais, levando a lutas, ferimentos e mortes entre eles. Ratos são animais sociais que vivem em grupos hierarquicamente organizados, e essa hierarquia leva tempo para ser estabelecida. A introdução de sujeitos estranhos é bastante perturbadora, tanto que a introdução de um sujeito novo é usada como um estímulo aversivo no modelo de estresse moderado e crônico (CMS- Cronic Mild Stress) (Willner, 1997). Esses fatores poderiam explicar os 15% de mortalidade encontrados nos sujeitos experimentais de Rockman.

Existem tantas variáveis que os autores não consideraram que se torna impossível afirmar que a criação em ambiente enriquecido leve a um aumento no consumo de ET, muito menos que isso não se deva ao isolamento desses animais por um período tão longo como 16 horas por dia.

De fato, em outro experimento, (Rockman & Gibson, 1992) o mesmo grupo não replicou seus próprios dados. Eles usaram ratos Sprague-Dawley criados na colônia e em isolamento, mas também em um ambiente similar à colônia, porém menor e com 5 sujeitos apenas em cada um, que chamaram de quase-enriquecido. Os grupos foram subdivididos de forma diferente, sendo eles: enriquecido/isolado, isolado,

isolado/quase-enriquecido, quase-enriquecido e quase-enriquecido/isolado. Todos os grupos continham 15 sujeitos.

O consumo de ET do grupo quase-enriquecido e do grupo isolado/quase-enriquecido foi medido dentro das colônias e, por isso, cada grupo de 5 animais foi considerado estatisticamente como um único sujeito, sendo o consumo total de ET dividido pelo peso somado de todos os animais naquele grupo. Os animais dos outros grupos, cujo consumo foi medido individualmente, foram selecionados aleatoriamente para compor grupos de 5 sujeitos que, então, foram considerados como um único sujeito. Nesse caso, apenas os animais do grupo isolado/quase-enriquecido apresentaram um consumo significativamente maior do que os outros grupos, que não apresentaram diferenças entre si. Ou seja, apenas os animais que, habituados a viverem sozinhos e apresentados a estranhos durante o período de exposição ao etanol, apresentaram maior consumo de ET. Considerando-se que o período de exposição ao ET foi de apenas 32 dias, que apenas os animais do grupo isolado e do quase-enriquecido não foram retirados de seus ambientes nesse período e não apresentaram diferenças de consumo entre si, não se pode afirmar de que modo a criação em ambiente enriquecido, ou em outro tipo de ambiente, influencia o consumo de etanol.

Outro experimento (Fernandez-Teruel et al., 2002) usou cepas especialmente selecionadas pelo seu comportamento de fuga no procedimento de “shuttle-box”: RHA/Verh, que apresenta uma aquisição rápida da resposta de fuga/esquiva e RLA/Vehr, com baixa aquisição dessa resposta. O experimento demonstrou um aumento no consumo de ET em ambas as linhas criadas em AE, quando comparadas a animais das mesmas linhagens criados em duplas, e aumento do consumo de sacarina nos animais RLA/Verh. Porém, novamente, o procedimento utilizado foi o de livre escolha entre duas garrafas, uma contendo água e a outra ET 10% ou sacarina. Os

animais do AE foram retirados de seu ambiente e alojados em duplas para esses testes. Os autores não descrevem como foram consideradas as medidas de consumo, sendo que havia dois animais por caixa, e apresentam apenas o consumo total dos grupos nos 4 dias de exposição ao etanol.

Em suma, os experimentos que mostram um aumento de consumo pelos animais criados em grupos, duplas ou colônias são aqueles em que estes animais tiveram seu ambiente alterado durante a fase de teste. De fato, pelo menos em primatas, mudanças de ambientes sociais para isolados, e vice-versa, causam alterações importantes no comportamento (Bayne, 2005).

Já um experimento comparando animais adolescentes mantidos em isolamento com animais adolescentes mantidos em duplas não encontrou diferenças de consumo entre esses grupos medido no paradigma de livre escolha entre duas garrafas quando este consumo foi medido no mesmo ambiente de criação (Thorsell, Slawecki, Khoury, Mathe, & Ehlers, 2005).

Outros experimentos demonstraram que ratos criados em grupo e isolados por um período de 24 horas consomem mais ET durante esse período do que quando na colônia, e se comparados a ratos mantidos em grupo. Também foi demonstrado que seus níveis de consumo nesse período são significativamente mais elevados, inclusive, do que os de ratos mantidos sempre em isolamento. Ou seja, a mudança de ambiente pode causar mudanças significativas no consumo de ET em ratos (Wolffgramm, 1990).

Comparando-se o consumo de ET e sacarose por animais criados desde o desmame em duplas com o de animais criados desde o desmame em isolamento, e quando a mensuração do consumo foi feita nas caixas viveiro, foi encontrado um aumento significativo no consumo de sacarose e de ET em concentração alta (16%) nos

animais em isolamento, em ratos Fawn-Hooded e Wistar (Hall, Huang, Fong, Pert, & Linnoila, 1998b). Também foi demonstrado um aumento no consumo de ET por ratos geneticamente selecionados pela sua preferência por etanol em isolamento. Tanto aqueles com alta quanto os com baixa preferência, criados em isolamento, apresentaram aumento no consumo de etanol quando comparados a animais das mesmas cepas criados em duplas (Ehlers et al., 2007). No entanto, o consumo de etanol medido nas gaiolas com duplas foi simplesmente dividido por dois, sem que fossem consideradas as diferenças de peso entre os animais, ou a competição pelo acesso ao bebedouro. Ambos os experimentos usaram o modelo de livre escolha entre duas garrafas, uma contendo solução alcoólica e a outra uma solução alternativa, para medir o consumo de ET.

Finalmente, em outubro de 2007, foi publicado um artigo explorando a questão que usou uma medida tomada em caixas operantes de consumo (Deehan, Cain, & Kiefer, 2007). Ratos Long-Evans foram criados desde os 21 dias de idade em três condições distintas: em isolamento, em duplas e em AE com 10 animais. Os animais foram privados de água aos 90 dias de idade e a modelagem de pressão a barra em caixa operante foi conduzida em sessões de 30 minutos com sacarose a 20% como reforçador. Na caixa operante havia duas barras, sendo uma ativa, cuja pressão dispensava a solução e a outra inativa, apenas registrando as respostas. O procedimento de introdução ao etanol foi o de *fade-in* do ET e *fade-out* da sacarose. O consumo de ET 10% foi medido em esquema de CRF em 5 sessões de 30 minutos, 10 sessões de 60 minutos e mais 5 sessões de 60 minutos em que a barra antes inativa passou a dispensar água. Os resultados mostram que os ratos criados em isolamento responderam significativamente mais pelo ET do que os animais dos outros grupos nas duas primeiras fases do teste, sem que isso afetasse as respostas na barra inativa.

Também apresentaram marcada preferência pelo ET em relação à água, o que não ocorreu nos dois outros grupos.

É necessário notar que nenhum dos experimentos acima fez uso de medidas de consumo de etanol que incluíssem alguma forma de intermitência no reforçamento, sendo que, quando se observa o fenômeno da dependência em humanos, dificilmente todas as repostas de obtenção ou consumo da droga são reforçadas. Existe uma grande intermitência no reforçamento e apenas algumas das respostas são reforçadas. Trata-se de esquemas de reforçamento não-contínuo. Dado que o esquema de reforçamento altera o padrão e a frequência de reposta (Ferster & Skinner, 1957), esse é mais um fator que deve ser levado em consideração ao tentar-se modelar em laboratório a dependência (Hartnoll, 1991).

A criação em isolamento social, quando comparada com a criação em grupo, afeta a preferência de ratos por diferentes dosagens de ET: animais criados em isolamento apresentam preferência significativamente mais alta por soluções com maior concentração de ET (Schenk, Gorman, & Amit, 1990; Wolffgramm, 1990). Seus padrões de consumo: os isolados consumiam grandes doses em pouco tempo, várias vezes durante o período escuro, enquanto que os animais agrupados consumiam doses pequenas de modo mais distribuído ao longo do dia (Wolffgramm, 1990).

Seres humanos são animais sociais e desenvolvem-se num ambiente mutável, com diversas oportunidades de exibirem comportamentos e uma gama de diferentes reforçadores disponíveis, inclusive drogas. Dentre as drogas, entre os diversos reforçadores disponíveis, existe o álcool, ao qual o acesso é especialmente fácil em nossa sociedade. Um modelo experimental que mimetize melhor a condição humana é importante para que se possa compreender a dependência do álcool.

Etanol

A forma como o ET atua no Sistema Nervoso Central (SNC) é bastante complexa e ainda não totalmente conhecida. Sabe-se, porém, que não existe um sítio específico de atuação. As moléculas de ET atuam em diversos sítios do SNC e de diferentes maneiras, podendo ligar-se a sítios específicos em diferentes receptores e modular o seu funcionamento, ou entrar nos canais de íons dos receptores e bloqueá-los. Uma de suas ações conhecidas é sobre os receptores de glutamato do tipo NMDA. Esses receptores são canais iônicos que, quando abertos, permitem a entrada de cátions levando à despolarização da célula e, portanto, a um potencial elétrico excitatório. O ET bloqueia esses canais, impedindo sua abertura, o que leva a uma diminuição da transmissão glutamatérgica. Os receptores NMDA estão ligados aos processos de aprendizagem e seu bloqueio parece estar ligado aos chamados *blackouts* alcoólicos (McKim, 2006). O aumento da sensibilidade aos efeitos excitatórios do glutamato que ocorre como adaptação ao uso contínuo do ET pode ser responsável pelos efeitos observados na síndrome de abstinência. O ET também atua sobre receptores de serotonina do tipo 5-HT₃ estimulando-os, o que aumenta sua abertura e a despolarização da célula pós-sináptica (McBride, et al, 2004). Aparentemente, isso leva a uma liberação de dopamina no núcleo accumbens, que faz parte do chamado circuito do reforço, e por isso relaciona-se aos efeitos reforçadores do etanol. O etanol também atua sobre os receptores de GABA (Suzdak, Schwartz, Skolnick, Paul, 1986) do tipo GABA-a, inibitório, aumentando essa inibição e diminuindo a atividade neuronal, o que se relaciona aos efeitos sedativos e depressores do etanol. Existem evidências de que o álcool também atua sobre o sistema opióide e sobre o funcionamento de enzimas no SNC (McKim, 2006; WHO, 2002).

Por ser uma droga legal em muitos países, o álcool é altamente acessível em grande parte do mundo. Nos últimos 20 anos, seu consumo per capita vem crescendo nos países em desenvolvimento, especialmente na Ásia e nos países da antiga União Soviética (WHO, 2002). Nas Américas, o consumo é maior entre homens jovens, e o Brasil apresenta uma média per capita de consumo anual de 8.6 litros de álcool, se considerada toda a população. Ao considerarmos apenas a parte da população que consome álcool (75% dos homens e 53% das mulheres acima de 15 anos), esse valor sobe para 12.1 litros por ano (estimativas da OMS). Apesar de seu potencial deletério e de o álcool ser a única droga cuja síndrome de abstinência em usuários pesados pode levar à morte (McKim, 2006), seu consumo é bastante aceito. O álcool ainda é considerado por muitos como uma “droga leve” ou nem como droga é visto.

No presente estudo compararam-se ratos Wistar albinos, uma cepa mista bastante utilizada em pesquisas, criados em AE ou em isolamento. Dado que existe na literatura variação e discussão a respeito da idade de introdução ao AE e do tempo de tratamento suficientes para causar alterações (Schenk et al., 1990), e que a formação e desenvolvimento de hierarquia dentro de um grupo social demandam tempo, no presente estudo optou-se pela criação dos animais nos diferentes ambientes desde logo após o desmame. O AE foi construído de forma a permitir que os animais desempenhassem comportamentos naturais da espécie importantes na manutenção de sua homeostase, como esconderijos, material para a construção de ninhos, objetos variados para a manipulação, objetos imóveis que possibilitassem movimentos diversos e objetos que pudessem ser roídos e usados para o desgaste dos dentes. A comida era escondida em locais diversos dentro do ambiente para possibilitar forrageamento (Baumans, 2005; Hutchinson et al., 2005). O ambiente de isolamento tratava-se do

ambiente padrão de laboratório, que segue as orientações do Guia de Uso e Cuidado de Animais de Laboratório para roedores (ILAR, 1997).

Auto-administração

Foi utilizado um modelo de auto-administração oral da droga, por mimetizar com maior fidedignidade a forma como o álcool é consumido como droga de abuso por seres humanos (Meisch, 2001). Devido às diferenças observadas entre os diversos tipos de criação na preferência por concentrações altas e baixas de ET, optou-se por uma dosagem média, 10%. Ratos são animais noturnos e seu período de maior atividade coincide com o final do período claro, início do período escuro. Por esse motivo, tal horário foi escolhido para as sessões de consumo de ET e a alimentação era fornecida logo após as sessões (Baumans, 2005). Para que a mudança de ambiente fosse controlada, os animais permaneceram em seus respectivos ambientes durante toda a duração dos experimentos, sendo deles retirados apenas para a pesagem e a duração das sessões experimentais, quando todos os animais eram colocados sozinhos em caixas operantes.

O uso do procedimento de fade-in de ET/fade-out de sacarose para a introdução do ET tem por objetivo evitar a aversão natural que os animais apresentam ao sabor do ET. Fazendo com que os animais consumam quantidade suficiente da solução afim de que obtenham doses ativas e associem o sabor do etanol, inicialmente aversivo, a seus efeitos, sem que ocorra a condição possivelmente aversiva de consumo forçado. Tem sido demonstrado que esse procedimento é eficiente em estabelecer comportamento operante em relação ao ET, mesmo em animais não privados de comida ou água, e que leva a taxas de respostas elevadas (Samson, Pfeffer, & Tolliver, 1988). Pelo mesmo

motivo, foi usado um agente de sabor, no caso, a sacarina, um adoçante não calórico, para tornar a solução alcoólica mais palatável.

Situações de estresse e ansiedade são um fator importante no abuso de bebidas alcoólicas, assim como no desencadeamento de transtornos psiquiátricos (Vaillant & Milofsky, 1982). O uso do álcool pode mesmo ser visto em certos casos como uma automedicação, por seus efeitos antidepressivos e ansiolíticos (Markou, Kosten, & Koob, 1998; Steele & Josephs, 1990). Do ponto de vista comportamental, a contingência aversiva altera o valor reforçador de agentes ansiolíticos como o ET. Por exemplo, animais mais sensíveis a estimulação aversiva tendem a consumir mais álcool do que os menos sensíveis (Kampov-Polevoy et al., 1996). Diferentes formas de estimulação aversiva estão associadas ao consumo de drogas, como ameaça, choques intermitentes, isolamento social, separação materna, restrição de comida etc. (Lu, Shepard, Scott Hall, & Shaham, 2003). Especialmente, o estresse moderado e de longo prazo encontra-se relacionado ao consumo de álcool (DeTurck & Pohorecky, 1987; Pohorecky, 1987; Weinberg, Taylor, & Gianoulakis, 1996). A ansiedade foi definida por Skinner como o termo que descreve as reações emocionais e respostas do sistema autônomo usualmente encontradas em situações da apresentação de estímulos que no passado precederam estímulos aversivos (Silva, 1997).

Torna-se interessante, assim, saber se a criação em diferentes ambientes proposta no presente trabalho alteraria os níveis de ansiedade dos animais e se esses níveis poderiam estar associados ao aumento de consumo de ET encontrado em alguns trabalhos com ratos criados em isolamento. Por este motivo, foi usado nesse trabalho um modelo de ansiedade incondicionada, o Labirinto em Cruz Elevado.

Trata-se de um modelo rápido e fácil, por não exigir treinamento ou privação, cujo equipamento necessário é barato, confiável e bastante usado na literatura. Tem

validade teórica, sendo sensível a procedimentos aversivos anteriores, e é capaz de selecionar ratos ansiosos de não ansiosos, que depois se diferenciarão em termos de consumo de ET (Silva, 1997; Spanagel et al., 1995). Além disso, é um modelo ecológico, valendo-se da aversão natural dos ratos a espaços abertos e altos (Rodgers & Cole, 1993). Nesse modelo, o número de entradas, e tempo dispendido nos braços abertos do labirinto são considerados como sendo inversamente proporcionais ao nível de ansiedade do animal: animais mais ansiosos exploram menos as áreas do labirinto onde estariam mais expostos a riscos. Um fator importante nesse modelo de ansiedade do labirinto em cruz elevado é a novidade do ambiente. Assim, uma desvantagem é que não se pode tomar medidas repetidas ou estabelecer uma linha de base (Silva, 1997). Trata-se de uma medida única, e, por isso, foi tomada em apenas uma sessão. Na literatura encontram-se exemplos de que a criação em isolamento pode alterar (Da Silva, Ramos, & Takahashi, 2004) ou não (Rodgers & Cole, 1993) o comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado.

O uso crônico de drogas leva à tolerância, uma adaptação do organismo ao efeito disruptivo da droga em sua homeostase e quando da retirada desse estímulo advém a abstinência. Esse processo está intimamente relacionado aos estímulos presentes no ambiente durante o uso da droga, que por condicionamento respondente passam a eliciar as respostas fisiológicas compensatórias aos efeitos da droga (Siegel, et al, 2000), na ausência da droga essas respostas representam uma alteração na homeostase do organismo e, portanto, um estressor. A abstinência aguda de drogas, e do álcool especificamente, vem sendo demonstrada como uma situação de estresse, elevando os níveis de corticosteróides significativamente (Adinoff et al, 1991; Pickworth & Fant, 1998; Escl et al, 2001; Stalder et al, 2010).

Tem sido demonstrado também que o uso de álcool reduz de forma importante os níveis de testosterona em machos, estando associado à feminilização encontrada em usuários crônicos (Cicero, Bernstein & Badger, 1978; Mendelson & Mello, 1977; Persky et al., 1977; King, Errico & Parsons, 1995; Forquer, Hashimoto, Roberts, Wiren, 2011).

Considerando-se o isolamento social como uma situação de estresse crônico pode-se hipotetizar que os animais criados nessa situação apresentariam uma resposta hormonal mais acentuada ao consumo e abstinência de álcool. Desta forma torna-se interessante investigar os níveis hormonais de corticosteróides e de testosterona durante o consumo e a abstinência de etanol nos animais criados em AE e I.

Usualmente, como em Moncek et al. (2004), utilizam-se amostras sanguíneas para estimar os níveis hormonais. Isso implica que nos animais de laboratório, devido ao seu tamanho reduzido, a retirada das amostras envolva técnicas cruentas como punção cardíaca e até o sacrifício dos animais, o que impossibilita estudos longitudinais. Além disso, também exige manipulação, imobilização dos animais e procedimentos dolorosos o que pode inclusive alterar esses perfis por se tratarem todos de estressores agudos. A mensuração de metabolitos hormonais excretados nas fezes, em que as fezes dos animais são coletadas e os subprodutos metabólicos dos hormônios marcados por imunoensaios, trata-se de um método não invasivo, repetidamente validado em diversas espécies (Palme, 2005). Essa técnica possibilita avaliação endócrina longitudinais, perfis de longo prazo, importantes no estudo de manipulações crônicas como é o caso do enriquecimento ambiental.

Atualmente, consideram-se preferencialmente três diferentes tipos de terapia medicamentosa para o tratamento da dependência de álcool em humanos: naltrexona, um antagonista competitivo do ET no sistema opioide; acamprosato, que modula o

funcionamento de receptores GABA e NMDA, contrabalanceando os efeitos do ET nesses sistemas; e a ondansetrona, bloqueador dos receptores de 5-HT₃ (Buonopane, 2005; McBride, 2004; Garbutt, 1999).

Diferentes experimentos tem mostrado que essas drogas atuam de maneiras diferentes no consumo de ET. A Naltrexona parece diminuir o consumo excessivo de álcool enquanto o acamprosato mantém abstinência (Rösner, Leucht, Leher, Soyka, 2008). A ondansetrona parece ser eficaz no tratamento da dependência de etanol apenas nos casos de início precoce, não sendo eficaz no tratamento de abuso de ET de início tardio (Kranzler, Pierucci-Lagha, Feinn & Hernandez-Avila; 2003). Outros estudos propõem que tanto a naltrexona quanto a ondansetrona reduzem a liberação de dopamina no VTA causada pelo ET, diminuindo a fissura pelo álcool (Myrick, Anton, Li, Henderson, Randall, Voronin, 2008). Ainda há evidências de que a ondansetrona atuaria aumentando a sensação subjetiva de intoxicação pelo álcool e/ou aumentando seus efeitos aversivos (Swift, Davidson, Whelihan, Kuznetsov, 1996)

Como antes mencionado, a literatura aponta diferenças de comportamento e de neurotransmissão entre animais criados em ambientes AE e animais criados em ambientes I. Por tanto, é possível imaginar que os efeitos sobre o consumo de ET da ondansetrona sejam diferentes para essas duas populações de ratos (AE e I). O presente estudo propõe-se a estudar os efeitos do tratamento com ONDA e da presença de reforçadores concorrentes em animais criados nos diferentes ambientes dentro de um modelo de auto-administração de ET.

Além de jogar luz sobre os funcionamentos neuroquímicos envolvidos no consumo de ET, os dados obtidos nesta pesquisa poderão fornecer melhores preditores de sucesso ou fracasso dos tratamentos, comparando a atuação da ondansetrona no consumo de ET com a sua atuação no consumo de um reforçador concorrente isocalórico.

Método

Sujeitos

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, com aproximadamente 21 dias de idade provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan (Experimento 1) e do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Experimento 2). Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Psicologia Experimental, o qual dispõe de controle de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação claro-escuro (12:12 horas). Os animais foram separados em dois grupos: um grupo mantido em uma colônia no ambiente enriquecido (AE), e outro composto de sujeitos isolados em gaiolas individuais (I). Para ambos os grupos eram oferecidas ração balanceada e água *ad lib* até o início da fase de modelagem de pressão à barra, quando foram colocados em regime de restrição de uma hora de comida por dia, suficiente para manter os animais em aproximadamente 90% do peso *ad lib*.

Ambiente

O ambiente enriquecido (AE) seguiu o modelo proposto por Fernandez-Teruel e outros (2002). Ratos foram criados em um viveiro de arame, com dimensões de 100x50x50 cm, onde eram colocados diversos objetos como bolas de plástico, figuras geométricas, gravetos, cordas pendentes etc. O ambiente contava com duas plataformas, com escadas e cordas ligando um andar ao outro, e também túneis e esconderijos diferentes. Os diferentes objetos apresentavam texturas, cores e tamanhos diversos. A comida e a água eram colocadas em partes diferentes do ambiente, que contava, ainda, com potes de cerâmica, elemento vazado e abrigos que podiam ser utilizados como ninhos pelos animais. Esses objetos eram rearranjados e/ou trocados periodicamente. O chão era recoberto com maravalha.

O ambiente isolado (I) consistia de caixas individuais padrão em polietileno transparente, de 25x40x20 cm, forradas com maravalha.

Equipamento

Foram usadas câmaras de condicionamento operante de fabricação Med Associates, de dimensões 32x25x21 cm, isoladas acusticamente. Cada caixa continha, em uma das paredes, duas barras (à direita e à esquerda da parede) de aproximadamente 5 cm de largura, colocadas a 8cm do chão da caixa. Sob cada barra, a 2 cm, era localizado um bebedouro. Pressões na barra direita acionavam o bebedouro direito e a pressões na barra esquerda acionavam o bebedouro esquerdo. Um estímulo luminoso de 1 W (luz branca), localizado 7 cm acima de cada barra, sinalizava a disponibilidade de reforço. Uma luz de 2 W localizada na parede esquerda, a 18 cm do chão, permanecia acesa durante toda a sessão experimental (*house light*). Cada caixa tinha um exaustor que fornecia circulação de ar e ruído branco.

O funcionamento das caixas e o registro das respostas foram feitos por meio de um computador IBM-PC, com programas e interface da Med Associates.

Labirinto em cruz elevado

Foi utilizado um labirinto em cruz elevado padrão, em madeira, consistindo de dois braços fechados opostos de 50x10x40 cm, dois braços abertos opostos de 50x10 cm, ligados a um espaço central de 10x10 cm. Os braços abertos eram cercados por um centímetro de polietileno transparente, a fim de evitar quedas. O aparelho era elevado a 50 cm do solo, e iluminado apenas por uma lâmpada fraca (15W) localizada 90 cm acima da área central.

Drogas e Soluções

O álcool etílico absoluto (Synth 99,5%) foi diluído em solução aquosa em diferentes concentrações, especificadas no procedimento. O álcool foi adoçado com sacarose (Açúcar União-SAC) em concentrações descritas no procedimento ou com sacarina sódica (NF Bristol-Myers) 0,25%. O componente hipercalórico maltodextrina (Nutry Carbo Maltodextrina Solaris Nutrition, sabor natural - MALTO) foi diluído em água nas concentrações descritas no procedimento.

A ondansetrona (Nausebron® cloridrato de ondansetrona injetável 2 mg/ml- Cristália- ONDA) foi dissolvida em solução de NaCl a 0,9% (VEI) para volume de 1 ml/kg de peso dos animais.

Procedimento

Experimento 1: Consumo de Etanol e disponibilidade de reforçadores concorrentes.

Os animais do grupo AE (n=11) foram criados no ambiente enriquecido e os do grupo I (n=11), no ambiente isolado. Os sujeitos foram introduzidos em seus respectivos ambientes aos 29 dias de idade, após 4 dias de habituação ao biotério, e foram mantidos com comida e água *ad lib* até os 135 dias de idade, quando foi iniciada a restrição alimentar para a modelagem da resposta de pressão à barra.

I) Consumo de ET

Fase 1. Treino:

A pressão às barras foi modelada por um esquema conjugado CRF – FT 60s . Então, foi utilizado um procedimento em que as barras eram ativadas de maneira aleatória dentro da mesma sessão, para evitar preferência por uma das barras, em um

esquema VR5-VR5. Ambos os dispensadores ofereciam a solução de SAC 10% como reforçador. Essa fase durou 15 sessões.

Fase 2. introdução de ET:

Nas quatro primeiras sessões da fase 2, pressões em uma das barras foram seguidas por solução de SAC, e pressões na outra barra, por água. Ambas as barras disponibilizaram os dois líquidos em esquema VR5 (concorrente VR5-VR5).

Mantendo-se o esquema concorrente VR5-VR5, a solução de SAC foi substituída gradualmente por uma de ET adoçado com sacarina, de forma a evitar aversão a ET. Os animais foram introduzidos ao ET com 192 dias de idade. A passagem de SAC a ET foi realizada pelo procedimento de *fade-in* de ET e *fade-out* de SAC, de acordo com a seguinte programação: 2 sessões com SAC10% + ET20%¹, 3 sessões com solução de SAC 10% + ET 2%; 3 sessões com SAC 10% + ET 5%; 3 sessões com SAC 5% + ET 5%; 3 sessões com SAC 5% + ET 10%; 5 sessões com SAC 2% +ET 10%, atingindo a solução de ET 10% em solução de sacarina a 0,25%. A água e a solução de ET tiveram suas posições alternadas aleatoriamente com a finalidade de evitar preferência de lugar.

Fase 3. Teste com restrição alimentar.

Foi utilizado um procedimento do tipo ABAB no qual a solução de ET adoçada com sacarina era disponibilizada de modo concorrente à água por quatro sessões (condição A1). Em seguida, a solução de ET foi disponibilizada concorrentemente à solução de maltodextrina 14,8% (MALTO - isocalórica à solução de ET), por cinco sessões (condição B1) e novamente à água por seis sessões (A2) e à MALTO por quatro sessões (B2).

Fase 4. Teste sem restrição alimentar.

¹ Os percentuais fazem referência à concentração de SAC ou ET da solução

Foi conduzido um teste similar ao teste 3 a fim de verificar se a restrição alimentar alteraria a relação entre o consumo de ET e a disponibilidade do reforçador isocalórico de forma concorrente. Os animais voltaram a receber comida *Ad Lib* e o consumo de ET foi medido contra a MALTO por quatro sessões (fase B) e contra água por quatro sessões (fase A), sempre em esquema VR5-VR5. Porém, devido a diversos problemas com os equipamentos, os dados do teste sem restrição alimentar foram comprometidos. Por esse motivo, os dados não serão apresentados.

II) Labirinto em Cruz elevado.

Entre a fase de treinamento (1) e a introdução do ET (2), a restrição alimentar foi retirada, para permitir o crescimento dos animais, e foi realizado um teste no labirinto em cruz elevado a fim de estimar os níveis de ansiedade incondicionada dos animais. Os animais foram testados no labirinto em cruz elevado em uma única sessão. Cada animal foi colocado no espaço central do labirinto, voltado para um dos braços fechados, e observado por 5 min por uma pesquisadora posicionada a 1,5 m do centro do labirinto. A pesquisadora anotou o tempo de latência, demora para entrar com os quatro membros em um dos braços, o tempo despendido e o número de entradas em cada braço. A entrada era computada apenas quando o animal ultrapassava a linha divisória do braço com os quatro membros.

Experimento 2: Consumo de Etanol, disponibilidade de reforçadores concorrentes e Ondansetrona.

Os animais do grupo AE (n=10) foram criados no ambiente enriquecido e os do grupo I (n=10) no ambiente isolado. Os sujeitos foram introduzidos em seus respectivos ambientes aos 25 dias de idade - após 4 dias de habituação ao biotério -, e foram mantidos com comida e água *ad lib* até os 63 dias de idade, quando foi iniciada a restrição alimentar para a modelagem da resposta de pressão à barra.

Fase 1. Treino

Fase similar à descrita para o Experimento 1.

Fase 2. Introdução ao ET

A introdução ao ET teve início aos 84 dias de idade dos sujeitos e deu-se de modo similar à descrita para o Experimento 1. Foram necessárias, no entanto, algumas alterações em função da baixa taxa de respostas dos sujeitos. A passagem de SAC a ET foi realizada pelo procedimento de *fade-in* de ET e *fade-out* de SAC, de acordo com a seguinte programação: 3 sessões com SAC10% + ET20%², 4 sessões com solução de SAC 10% + ET 2%; 4 sessões com SAC 10% + ET 5%; 3 sessões com SAC 5% + ET 5%; 3 sessões com SAC 10% + ET 10%; 3 sessões com SAC 8% + ET 10%; 2 sessões com SAC 6% + ET 10%; 2 sessões com SAC 4% + ET 10%; 3 sessões com SAC 2% + ET 10%³, atingindo a solução de ET 10% adoçado com sacarina a 0,25%. A água e a solução de ET tiveram suas posições alternadas aleatoriamente com a finalidade de evitar preferência por um lado. Deste ponto em diante, a solução de ET foi mantida (ET 10% adoçado com sacarina a 0,25%) e passará a ser referida no texto apenas como solução de ET.

Fase 3. Teste com restrição alimentar

O teste de preferência e consumo de ET em função do tipo de reforçador concorrente (água ou MALTO) foi realizado de acordo com a Tabela 1. Foram 10 sessões consecutivas durante as quais as soluções eram alternadas de modo balanceado - tanto o reforçador concorrente disponível quanto o lado em que eram dispensados. Ao final, foram 5 sessões da solução de ET10% adoçado com sacarina 0,25% concorrendo com a água (ET x Água 1) e 5 sessões concorrendo com MALTO 14,8% (isocalórica).

² Os percentuais fazem referência à concentração de SAC ou ET da solução

³ Por um problema, foi utilizado, inadvertidamente, o adoçante Finn® na solução de ET, ao invés da sacarina em concentração de 1,6% em um conjunto de sessões. O adoçante contém sorbitol, sacarina sódica e ciclamato de sódio, ácido benzóico e metilparabeno (conservantes) em concentrações desconhecidas. Por esse motivo os dados referentes a esses dias foram desconsiderados.

Tabela 1. Procedimento teste com restrição alimentar.		
	Solução	
Sessão	Esquerda	Direita
1	AGUA	ET
2	ET	AGUA
3	ET	MALTO 14,8%
4	AGUA	ET
5	MALTO 14,8%	ET
6	ET	MALTO 14,8%
7	AGUA	ET
8	MALTO 14,8%	ET
9	ET	MALTO 14,8%
10	ET	AGUA

Fase 4. Ponto de indiferença entre ET e MALTO.

Ao final do teste com restrição alimentar, foi observado que o consumo de ET quando concorrente à solução de MALTO 14,8% (isocalórica ao ET) teve uma queda abrupta, reduzindo-se a praticamente zero, o que inviabilizou o teste da droga. Então, optou-se por buscar um ponto de indiferença entre as soluções, reduzindo-se gradativamente a concentração de MALTO. Chegou-se à concentração de 0,3% de MALTO sem que houvesse estabilidade de respostas e/ou ponto de indiferença. Optou-se, então, por utilizar uma solução de MALTO 1% concorrente ao ET, pois nessa concentração a taxa de respostas dos animais era alta em ambas as alternativas.

Fase Fase 5. Teste ONDA 0,1mg/kg

Para o teste do efeito da droga, foram contrabalanceadas a ordem de injeção da droga e de VEI. Inicialmente, então, metade dos sujeitos recebeu a droga e a outra metade recebeu o VEI. Em seguida, as condições foram invertidas. Dessa forma foi controlado um possível efeito de ordem, possibilitando também análise dos dados intrassujeito. Além disso, tal delineamento permitiu uma redução do número de animais utilizados.

Cinco animais do grupo AE (sujeitos 1AE, 2AE, 6AE, 7AE, 8AE) e cinco do grupo I (1I, 2I 3I, 6I, 7I) foram designados para o grupo A. O restante dos animais foi designado para o grupo B (sujeitos 3AE, 4AE, 5AE, 9AE, 10 AE e 4I, 5I, 8I, 9I, 10I). Conforme mostrado na Tabela 2, O grupo A recebeu injeções subcutâneas de 0,1mg/kg de ONDA nas primeiras 6 sessões o grupo B recebeu injeções subcutâneas de VEI em volume equivalente. Nas 6 sessões seguintes, as condições foram invertidas. O grupo B recebeu a droga e o A, VEI. Todas as injeções foram administradas 30min antes das sessões.

Tabela 2. Procedimento de teste de ONDA			
		Solução	
	Sessão	Esquerda	Direita
DROGA GRUPO A	1	AGUA	ET
	2	ET	AGUA
	3	ET	MALTO 1%
	4	AGUA	ET
	5	MALTO 1%	ET
	6	ET	MALTO 1%
DROGA GRUPO B	7	AGUA	ET
	8	MALTO 1%	ET
	9	ET	ÁGUA
	10	ET	MALTO 1%
	11	MALTO 1%	ET
	12	ET	ÁGUA

Fase 6. Teste sem restrição alimentar

Três dias após término do teste com restrição alimentar, foram realizadas três sessões com a solução de ET concorrente à solução de MALTO 14,8% e três sessões com a solução de ET concorrente à água sem que houvesse restrição alimentar. A ordem das soluções concorrentes não foi aleatória, mas deliberadamente planejada, a fim de minimizar

um possível efeito de contraste entre as soluções de 14,8% e 1% de MALTO na fase seguinte.

Fase 7. Teste ONDA 0,4mg/kg

Retomada a restrição alimentar, foi realizada uma sessão com a solução de ET concorrente à água (ET x Água 2). Foi, então, utilizado o mesmo procedimento descrito na Fase 5 (ver Tabela 2), com a única diferença sendo a dose de droga injetada, que passou a ser de 0,4mg/kg.

Fase 8. Abstinência

No dia seguinte ao final da fase 7 foi, realizada uma única sessão com a solução de ET concorrente à água (ET x Água 3). Então, o ET foi retirado da solução e, repetindo-se o esquema de sessões do grupo A (ver Tabela 2), foram realizadas 6 sessões em que solução de sacarina 0,25% era disponibilizada de modo concorrente a água ou a MALTO 1%.

Fase 9. Lateralidade.

Uma semana após o termino dos experimentos, foi realizada uma sessão em que os animais, sem restrição alimentar, receberam água ao responderem em esquema de VR5 em ambas as barras - a fim de se estimar preferência por uma das barras.

Experimento: 3 Corticosterona fecal em função de fase experimental.

Em cinco momentos distintos do Experimento 2, foram coletadas fezes para a análise de metabólitos fecais de corticosterona, sendo os momentos os seguintes: 1- Após sessão da Fase 3 do experimento em que o concorrente ao ET era a MALTO 14,8%, 2- Após sessão da Fase 3 do experimento em que o concorrente era água, 3- No primeiro dia da Fase 8 de abstinência (Efeito Abstinência), 4 – Após a última sessão da Fase 8 do experimento, já retirada a restrição alimentar (Efeito sessão operante sem restrição alimentar) e 5- 30 dias depois de finalizada a última sessão da Fase 9, quando não houve mais nenhuma manipulação experimental, exceto a divisão dos grupos AE e I (Efeito grupos AE e I). A fim de controlar o horário, essa coleta foi realizada entre as 15:00 e 15:00h do dia seguinte, mesmo horário em que eram coletadas quando havia sessões experimentais.

Para a coleta de fezes, as caixas viveiro de AE e I foram limpas, forradas com papel absorvente e maravalha, e os animais foram devolvidos a seus respectivos ambientes imediatamente após o término da sessão experimental. Foi coletado o total de fezes de 24 horas, quando os animais foram removidos de seus ambientes para a sessão do dia seguinte. As fezes foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos identificados, e imediatamente congeladas em freezer doméstico a – 20°C.

Os animais foram mantidos durante todo o período em seus respectivos ambientes. Por esse motivo, as amostras do grupo AE referem-se ao grupo, não sendo possível a coleta individual.

, Para a extração dos metabólitos, as fezes foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas. Obedecendo o protocolo de extração de esteróides fecais descrito por Palme (Palme et al 2013), foram colhidas e numeradas amostras de 0,5g cada coleta. As amostras foram diluídas em 5ml metanol 80%, colocadas em multivortex por 20 min e centrifugadas por 15 min. Uma alíquota de 1,5ml do líquido sobrenadante de cada amostra foi transferida para um microtubo devidamente identificado e armazenada em freezer para

análise posterior. As análises foram conduzidas utilizando-se kit comercial *Corticosterone ELISA kit ADI-900-097* (Enzo Life Sciences) já validado para análise de corticosterona fecal em ratos (Siswanto, H e cols, 2008). O kit apresenta sensibilidade de 27,0 pg/ml (32,0 – 20000,0 pg/ml) e a análise foi conduzida segundo o protocolo recomendado pelo fabricante (www.enzolifesciences.com/ADI-900-097/corticosterone-elisa-kit/). Testes de diluição foram feitos com quatro amostras. Foram testadas as diluições de 1/10, 1/100, 1/500 e 1/1000, os resultados indicaram a diluição 1/100 como adequada para as quatro amostras. As amostras foram todas testadas em duplicata, apresentando coeficientes de variação intraensaio todos inferiores a 6,94 e interensaio de 0,85%. As concentrações foram expressas em ng/g de fezes.

Análise dos resultados

Os dados de cada um dos experimentos foram analisados independentemente. Foram utilizadas ANOVA não-paramétricas de dados ordinais com medidas repetidas (**ANOVA-Type Statistic**–ATS) com fatores intra-grupo (número de resposta, consumo ou preferência pelo ET) e fator entre-grupos (condição ambiental AE ou I). ATS analisa os efeitos relativos do tratamento, ou seja, a tendência de que sujeitos de um grupo apresentem valores maiores ou menores de uma variável dependente em se considerando os valores obtidos pelo grupo de sujeitos como um todo, baseado no ranqueamento desses valores (Erceg-Hurn & Mirosevich, 2008). Esse tipo de análise apresenta a vantagem de poder ser conduzida com grande grau de confiabilidade em amostras não-normais e/ou que não apresentem homogeneidade de variância, o que ocorre frequentemente nos experimentos de psicologia (Erceg-Hurn, ET AL 2008). A análise pode, inclusive, ser utilizada quando a distribuição é desconhecida. Os efeitos relativos do tratamento variam entre zero e 1,0, sendo o valor de 0,5 quando não há efeito do tratamento. As variações desses valores são então analisadas quanto à significância estatística para um valor de $p < 0,05$ corrigido pelo número de testes realizados com as mesmas variáveis. Foram utilizadas macros para o Microsoft Excel® desenvolvidas pelo Professor Julio da Motta Singer, disponíveis em: <http://www.ime.usp.br/~jmsinger/doku.php>

Resultados

Experimento 1

I) Consumo de ET

Fase3. Teste com restrição alimentar

A média de consumo de ET por animal quando concorrente a água variou de 0,96g/kg de peso corporal a 2,3g/kg de peso corporal para o grupo AE, e de 1,4g/kg a 2,86g/kg de peso corporal para o grupo I, o que são consideradas doses ativas de ET (Porrino, Whitlow, & Samson, 1998). Trata-se de uma medida indireta, calculada a partir do número de reforços recebidos numa sessão.

A análise dos dados mostrou que não houve diferença entre as condições A1 e A2 ($p=0,999$), nem entre as condições B1 e B2 ($p=0,999$), indicando que houve reversão de cada condição. Por esse motivo, os dados das condições A1 e A2 foram agrupados em fase A em forma de média para as análises subsequentes, assim como os dados das condições B1 e B2 foram agrupados sob o título de condição B.

Com a introdução do reforçador concorrente isocalórico (condição B), tanto o número de respostas (Figura 1a) quanto o consumo (Figura 1b) de ET de ambos os grupos diminuiu significativamente ($Q_A=65,7142$; $gl=1$; $p=0,00005E-11$ e $Q_A=73,7824$; $gl=1$; $p=0,00001E-12$; respectivamente), em relação à condição A.

Figura 1. Distribuição de Respostas e consumo de ET em função de introdução de concorrente isocalórico. A Figura mostra a média $\pm$ EP das repostas nas alternativas (a) e a média $\pm$ EP de consumo de ET em g/kg concorrente à água (condição A) e com introdução de concorrente isocalórico (condição B) por grupo AE e I. O número de respostas e o consumo de ET diminuíram significativamente quando da introdução do concorrente isocalórico ($p < 0,0001$). Os sujeitos do grupo I responderam e consumiram significativamente mais ET na condição A quando comparados aos animais do grupo AE ($p = 0,0025$), mas não quando havia o concorrente isocalórico ($p = 0,2133$)

Quando comparadas as respostas no ET às respostas nas soluções concorrentes (Figura 1a), observa-se que há diferenças significativas na resposta pelo ET entre os grupos apenas quando a água, e não a MALTO, está disponível como concorrente ($QA=9,142$; $gl=1$; $p=0,0025$ e $QA=1,5485$; $gl=1$; $p=0,2133$, respectivamente), sendo que os animais do grupo I respondem mais pela solução de ET e pela água quando comparados aos animais do grupo AE. Ao se analisar a preferência pela solução de ET (Figura 2) não se observa diferença significativa entre os grupos AE e I ($QA=0,0072$; $gl=1$; $p=0,9323$).

Figura 2. Preferência por ET por condição entre grupo AE e I. A figura mostra a média $\pm$ EP do consumo de ET em g/kg por grupo AE e I quando concorrente a água (ET A) ou MALTO (ET B). Não houve diferença significativa entre os grupos AE e I ($p=0,9323$). A preferência pelo etanol diminuiu significativamente quando da introdução do concorrente isocalórico ($p<0,0001$).

II) Labirinto

Os grupos I e AE não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em quaisquer dos comportamentos estudados no labirinto em cruz elevado. São eles: latência inicial para entrar em um dos braços, tempo despendido nos braços fechados; número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados; total do número de entradas nos braços abertos e fechados e tempo despendido nos braços abertos, este último mostrado na Figura 3. Todas essas medidas mostraram-se altamente correlacionadas; por esse motivo, optou-se

por apresentar apenas o tempo despendido nos braços abertos do labirinto, frequentemente interpretado como inversamente proporcional ao nível de ansiedade incondicionada dos animais (Rodgers & Cole, 1993; Silva, M. T. A., 1997; Spanagel, R., Montkowski, A., Allingham, K., Stohr, T., Shoaib, M., Holsboer, F., et al., 1995). Não houve qualquer diferença entre as médias de tempo despendido nos braços abertos dos grupos AE e I ($t = 0,003$; $p = 0,998$).

Figura 3: Tempo em braços abertos. Apresenta a média $\pm$ EP do tempo em segundos despendido pelos animais de cada grupo (AE e I) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Não houve diferença significativa entre os grupos ($t = 0,003$; $p = 0,998$).

Experimento 2.

Fase 3. Teste com restrição alimentar.

A frequência de respostas na barra que dispensava ET (Figura 4a) do grupo I, assim como o seu consumo de ET (Figura 4b), foi significativamente maior que a frequência de respostas e consumo do grupo AE nas situações em que a solução de ET era dispensada concorrentemente à água ($QA = 5,1815$; $gl = 1$; $p = 0,0228$ e $QA = 8,7852$; $gl = 1$; $p = 0,0030$, respectivamente).

Figura 4. Frequência de respostas na barra e consumo de ET. A figura mostra a média $\pm$ EP de frequência de respostas (a) e média do consumo (b) de ET em g/kg por grupo AE e I quando concorrente a água. O grupo em isolamento apresentou, de forma significativa, maior frequência (a) ($p=0,0228$) e maior consumo (b) ($p=0,0030$) em relação aos animais em ambiente enriquecido.

Figura 5. Preferência pela solução de ET. A figura mostra a média $\pm$ EP da proporção de respostas no ET quando concorrente a água nas diferentes fases. Houve interação entre os fatores grupo, AE e I, e fases 1, 2 e 3. Inicialmente o grupo I prefere mais a solução de ET quando comparado ao grupo AE e a preferência se inverte na fase 3 ($p=0,0011$).

Quanto à preferência pela solução de ET (Figura 5), ocorreu uma inversão. O grupo I apresentou inicialmente maior preferência pela solução de ET, mas ao final (ET x Água 3) essa situação se inverte: o grupo AE preferindo mais a solução de ET quando comparado ao grupo I (Interação: $Q_A=10,5439$; $gl=1,6702$; $p=0,0011$). Essa inversão deveu-se não a um aumento ou diminuição das respostas na barra que dispensava ET, mas sim a um aumento, por parte dos sujeitos do grupo I, nas respostas para água, e, também, uma diminuição das respostas dos sujeitos do grupo AE para água (Interação: $Q_A=10,8860$; $gl=1,5568$; $p=0,0009$).

Comparando-se as respostas e a preferência (Figura 6b) pela solução de ET quando das diferentes doses de MALTO disponíveis como concorrentes (MALTO 0%-água; MALTO1% e MALTO14,8%), houve diferença tanto entre os grupos AE e I ($Q_A=7,8355$; $gl=1$; $p=0,0051$ e $Q_A=10,4015$; $gl=1$; $p=0,0012$, respectivamente), quanto em função da dose de MALTO ($Q_A=92,5382$; $gl=1,9223$; $p<0,0001$ e $Q_A=221,2709$; $gl=1,9982$; $p<0,0001$, respectivamente). Com o aumento das doses de MALTO como concorrente ao ET, tanto as respostas quanto o consumo (Figura 6a), e a preferência (Figura 6b) pela solução de ET diminuiriam substancialmente. É interessante notar que, embora tenha havido diferenças entre os grupos AE e I na preferência pela solução de ET quando das concentrações de 0% (água) e 14,8% de MALTO, não houve diferença

entre os grupos na preferência quando da concentração de MALTO 1% - em torno de 25% das respostas na barra que dispensava ET. Quando concorrente a MALTO 14,8% as respostas, o consumo e a preferência pela solução de ET tornaram-se irrisórias, mesmo que estatisticamente significativa a diferença entre os grupos é irrelevante em termos de ordem de grandeza, pois apenas 0,1% das respostas do grupo AE e 3% das respostas do grupo I foram na barra que dispensava ET (Figura 6b).

Figura 6. Consumo e preferência em função das diferentes doses de MALTO concorrentes. A figura mostra a média $\pm$ EP do consumo de ET em g/kg quando concorrente a MALTO 0%, 1% e 14,8% (a) e a proporção de respostas no ET quando concorrente a MALTO 0%, 1%

e 14,8% (b). O aumento das doses de MALTO como concorrente ao ET diminuiu substancialmente tanto o consumo quanto a preferência pela solução de ET ($p < 0,0001$). Os animais do grupo I consumiam e preferiam significativamente mais o ET quando comparado ao grupo AE ($p = 0,0051$ e $p = 0,0012$, respectivamente).

Fases 5 e 7. Testes de diferentes dosagens de Ondansetrona

Os efeitos das diferentes doses de ONDA quando a solução concorrente disponível era a água, foram analisados em um modelo estatístico que comparou a situação de salina (média) com as doses de 1mg/kg e 0,4mg/kg. Em outro modelo estatístico, foram comparados os mesmos tratamentos quando a solução concorrente disponível era MALTO 1%. Por esse motivo, foi utilizada correção de Bonferroni. Quando houve diferenças intrassujeitos, foram conduzidas análises *pós-hoc* e recalculados os índices de significância.

Não houve diferenças nas respostas (Figura 7a), consumo (Figura 7b) e preferência (Figura 7c) por ET entre os grupos AE e I – análise entre sujeitos ($Q_A = 2,2474$; $gl = 1$; $p = 0,1338$; $Q_A = 4,0301$; $gl = 1$; $p = 0,0447$ e $Q_A = 1,8381$; $gl = 1$; $p = 0,1751$, respectivamente), nem alteração nessas medidas em função das doses de ONDA testadas (análises intrassujeitos) quando a água era o reforçador concorrente disponível ($Q_A = 0,1195$; $gl = 1,4059$; $p = 0,7295$; $Q_A = 1,2206$; $gl = 1,4134$; $p = 0,2692$ e $Q_A = 0,2099$; $gl = 1,8359$; $p = 0,6468$, respectivamente). É importante notar que a diferença que havia entre os grupos AE e I na preferência pela solução de ET quando o concorrente era a água (Figura 5) desapareceu quando da injeção de salina (Figura 7c), sendo que ocorreu um aumento substancial das respostas especialmente do grupo AE, na barra que dispensava o ET: de média de 288 respostas (75%) os sujeitos do grupo AE passam a média de 342 respostas (87%) pelo ET, enquanto o grupo I passou de média de 411 respostas (87%) para 435 (82%). Então, houve um efeito importante do tratamento com as injeções, especialmente para os sujeitos do grupo AE.

Figura 7. Respostas, consumo e preferência por ET. Não houve diferenças nas respostas (a) ($p=0,1338$), consumo (b) ($p= 0,0447$) e preferência (c) ($p= 0,1751$) por ET entre os grupos AE e I, nem alteração nessas medidas em função das doses de ONDA testadas quando a água era o reforçador concorrente disponível ($p=0,7295$), ($p= 0,2692$) e ($p= 0,6468$).

Quando a solução de MALTO 1% estava disponível, houve diferença significativa entre os grupos em termos de respostas (Figura 8a) e consumo de ET (Figura 8b), mas não

para a preferência (Figura 8c) pela solução de ET (QA=5,1734; gl=1; p=0,0229; QA=10,2409; gl=1; p= 0,0013 e QA= 0,0654; gl=1; p= 0,7980, respectivamente). Houve diferenças significativas intrassujeitos para a frequência de respostas (Figura 8a), o consumo (Figura 8b) e a preferência (Figura 8c) pela solução de ET (QA=6,3513; gl=1,8478; p=0,0117; QA= 7,1622; gl=1,6990; p= 0,0074 e QA= 5,8188; gl=1,8326; p= 0,0158, respectivamente). A análise *pós-hoc* mostrou que essas diferenças foram significativas em termos de respostas, consumo e preferência pela solução de ET apenas na comparação entre ONDA 0,1mg/kg/ e ONDA0,4mg/kg (p= 0,0023; p= 0,0005 e p= 0,0041, respectivamente), mas não houve diferença para as comparações entre as doses de ONDA e a salina.

Figura 8. Respostas, consumo e preferência por ET quando concorrente era MALTO 1%. Houve diferença significativa entre os grupos em termos de respostas **(a)** ($p=0,0229$) e consumo de ET **(b)** ($p= 0,0013$), mas não para a preferência **(c)** ($p= 0,7980$).

Em resumo, as doses de ONDA apresentaram efeitos opostos no comportamento em função de ET. A dose de 0,1mg/kg diminuiu a média de consumo dos grupos e a dose de 0,4mg/kg aumentou essa média. No entanto, essas diferenças foram muito pequenas, mostrando-se estatisticamente não significantes quando comparadas à salina

A administração de ONDA, quando comparada a salina, não teve efeito sobre as respostas pela água para ambos os grupos (QA=0,4803; gl=1,7094; p=0,4882; dados não mostrados). No entanto, houve diferença significativa intrassujeitos para as respostas por MALTO 1% (Figura 9; QA= 5,0636; gl=1,9286; p= 0,0244). A análise *pós-hoc* mostrou que essa diferença foi significativa apenas para a comparação entre a ONDA0,1mg/kg/ e ONDA0,4mg/kg (p= 0,0026) Não houve diferenças significativas entre os grupos AE e I (QA=3,7424; gl=1; p=0,0530). Novamente, as doses da droga apresentaram efeitos opostos, mas muito discretos. A dose de 0,1mg/kg aumentou ligeiramente o consumo de MALTO1%, enquanto a dose 0,4mg/kg diminuiu. Dessa forma, o consumo de MALTO 1% na situação da injeção de salina ocupa uma posição intermediária, que não se diferencia estatisticamente do consumo quando aplicadas as diferentes doses de ONDA.

Figura 9. Frequência de respostas por ET concorrente a água na administração de ONDA e na administração de salina. Não houve efeito sobre as respostas pela água para ambos os grupos. No entanto, houve diferença significativa intrassujeitos para as respostas por MALTO 1%

A frequência de resposta na barra que dispensava solução de ET quando retirada a restrição alimentar caiu em muitos casos a zero, ou próximo de zero. Muitos dos sujeitos dormiram na caixa experimental durante as sessões. Mesmo assim, com a introdução do reforçador concorrente isocalórico, as respostas pelo ET de ambos os grupos diminuíram significativamente ($QA=26,0325$; $gl= 1$; $p=0,0003E-3$). Além disso, os animais do grupo I responderam significativamente mais pelo ET, quando comparados aos animais do grupo AE ($QA=15,5632$; $gl= 1$; $p=0,0001$). Já a frequência de resposta pelas soluções concorrentes na condição *ad lib*, quando comparadas às situações equivalente com restrição alimentar, variaram bastante entre os indivíduos. No entanto, não houve diferenças significativas intrassujeitos ($QA=0,6085$; $gl= 1$; $p=0,4353$ para respostas por água e $QA= 2,5208$; $gl= 1$; $p= 0,1123$ para respostas por MALTO) e entre os grupos ($QA= 0,0312$; $gl= 1$; $p= 0,8596$ para respostas por água e $QA= 2,7813$; $gl= 1$; $p= 0,0953$ para respostas por MALTO).

Fase 8. Teste em abstinência

Na situação de abstinência, quando o ET foi retirado da solução, as respostas pela solução de sacarina (Figura 10a) aumentaram significativamente apenas quando água estava disponível ($QA= 20,5231$; $gl=1$; $p= 5,9596E-6$), mas as repostas pela água (Figura 10a) também aumentaram ($QA= 111,1106$; $gl=1$; $p= 7,6437E-26$), enquanto as respostas pela MALTO1% (Figura 10b) diminuíram significativamente ($QA= 8,0299$; $gl=1$; $p= 0,0046$) quando comparadas às respostas por MALTO1% contra a solução de ET. Dessa forma, a preferência pela solução de sacarina quando concorrente à água (Figura 10c) não se alterou ($QA= 0,0543$; $gl=1$; $p= 0,8156$), e aumentou ligeiramente quando concorrente à solução de MALTO (Figura 10d) ($QA= 4,9489$; $gl=1$; $p= 0,0261^4$). O grupo I responde mais, tanto com a água concorrente (Figura 10a) quanto com a MALTO concorrente (Figura 10b) ($QA= 7,0518$; $gl=1$; $p= 0,0079$ e $QA= 5,2211$; $gl=1$; $p= 0,0223$, respectivamente), porém não há diferenças entre os grupos na preferência pela solução de sacarina (Figura 10c e 10d) na situação de abstinência ($QA= 0,1363$; $gl=1$; $p= 0,7119$ e $QA= 0,0325$; $gl=1$; $p= 0,8569$, respectivamente).

⁴ Tendência: significância corrigida $p<0,025$

Figura 10. Teste em situação de abstinência. Quando o ET foi retirado da solução, as respostas pela solução de sacarina **(a)** aumentaram significativamente apenas quando água estava disponível, mas as repostas pela água **(a)**. Respostas pela MALTO1% **(b)** diminuíram significativamente. A preferência pela solução de sacarina quando concorrente a água **(c)** não se alterou e aumentou quando concorrente a solução **(d)**

Fase 9. Teste de lateralidade

Houve discreta preferência pela barra da direita. Em média, aproximadamente 65% das respostas dos sujeitos de ambos os grupos na situação água/água sem restrição alimentar foram nessa barra e não houve diferença significativa entre os grupos AE e I (QA= 0,0121; gl=1; p= 0,9120).

Análise por sujeitos

Na Fase 3, quando concorrente à água (ET x Água 1), as médias de consumo de ET por indivíduo variaram entre 0,6980g/kg e 2,8104g/kg para o grupo AE, e entre 1,1104g/kg e 3,2374g/kg para o grupo I, o que são consideradas doses ativas de ET (Porrino, Whitlow, & Samson, 1998). Nas fases em que o concorrente disponível era MALTO 14,8% e quando não havia privação, diversos animais falharam em receber doses ativas de ET. Nenhum dado, no entanto, foi excluído da análise. O sujeito 2 do grupo AE apresentou média de consumo muito baixa em praticamente todas as fases subsequentes do experimento, não atingindo doses ativas, o que caracterizaria um animal *non-preferring*. O sujeito 9 do grupo I também apresentou médias de consumo baixas em todas as fases do experimento, mas recebeu doses ativas na maior parte delas. Os sujeitos 1 e 8 do grupo I apresentaram consumo elevado na maioria das fases do experimento, obtendo as maiores médias de consumo: 3,9761g/kg para o sujeito 1I (ET x Água 3) e 4,3910g/kg para o sujeito 8I (ONDA 0,1mg/kg- com água concorrente). Para o grupo AE, a maior média de consumo foi de 2,9049g/kg (sujeito 4AE- fase ONDA 0,4mg/kg, com água como concorrente).

Ao serem ordenados pela média de consumo de ET durante o experimento, os sujeitos 2AE, 9I, 3AE e 3I apresentaram o menor consumo pela ordem. Nas colocações intermediárias estão todos os outros sujeitos de grupo AE, sendo que o sujeito 4AE é o que apresenta o maior consumo do grupo. Todas as posições de consumo médio mais elevado são ocupadas por animais do grupo I, sendo os sujeitos 1I e 8I aqueles com o maior consumo médio.

A figura 11 apresenta o consumo dos sujeitos com maior e menor consumo durante as diferentes fases do experimento quando os concorrentes disponíveis eram água (a) e MALTO (b). Observou-se que, quando o concorrente era água, a dose de 0,1mg/kg de ONDA pareceu ter aumentado o consumo do sujeito 8I, enquanto a dose de 0,4mg/kg não teve efeito quando comparada à salina. Para o sujeito 4AE, ambas as doses pareceram aumentar ligeiramente o consumo de ET, enquanto para os outros sujeitos não tiveram efeito, ou diminuíram o consumo. Quando concorrente a MALTO, também pode-se observar que não houve um padrão no comportamento dos sujeitos em função das doses de droga, e o mesmo pode ser dito em relação à preferência pela solução de ET (Figura 12).

Figura 11. Dosagens consumidas pelos sujeitos com maior e menor consumo durante as diferentes fases do experimento quando o concorrente disponível era água **(a)** e MALTO **(b)**

Figura 12. Para o sujeito 4AE, ambas as doses parecem aumentar ligeiramente o consumo de ET, enquanto que para os outros sujeitos não têm efeito ou diminuem o consumo. Quando concorrente a MALTO **(b)** também pôde-se observar que não houve um padrão no comportamento dos sujeitos em função das doses de droga

Experimento 3 Análise de Corticosterona Fecal

A Figura 13 mostra a concentração de corticosterona e metabólitos fecais para os grupos AE e I (média) em ng/g de fezes (a) e os efeitos relativos do tratamento para os grupos AE e I (b). Os dados obtidos referem-se a amostras de fezes do grupo AE como um todo, não sendo, portanto, passíveis de análise estatística.

Figura 13. Corticosterona fecal. Dados da concentração da substância e metabólitos para os grupos AE e I (média) em ng/g de fezes **(a)** e os efeitos relativos do tratamento para os grupos AE e I **(b)**

É possível observar, no entanto, que o grupo AE apresentou uma maior variação na excreção de corticosterona, sendo aparentemente mais sensível às manipulações experimentais. A excreção foi menor quando o ET foi dispensado concorrentemente à água e quando foi retirada a privação, e bastante aumentada na situação de abstinência e quando não ocorreram mais sessões experimentais.

Os dados para o grupo I foram obtidos por sujeito, então, foi utilizada uma ANOVA não-paramétrica para dados ordinais com medidas repetidas. Essa análise mostrou que houve diferença significativa na excreção de corticosterona para o grupo I em função da

fase experimental ($QA = 3,4699$; $gl = 2,8053$; $p = 0,0311$). A análise *pós-hoc*, porém, mostrou que essa diferença foi significativa apenas para a comparação da medida de Efeito de Grupos AE e I, sem outras manipulações, e a medida sem restrição alimentar pós sessão operante ($p = 0,0039$), não sendo significativas ($p > 0,0125$) as diferenças entre a medida de Linha de Base e das fases restantes (ET x Água: $p = 0,0245$; ET x MALTO: $p = 0,0310$; Abstinência: $p = 0,3143$).

Discussão

Os resultados do experimento 1 mostraram que os animais do grupo I respondiam e consumiam consistentemente mais solução de ET quando comparados ao grupo AE quando a solução concorrente era água, mas não quando a solução concorrente era MALTO. No entanto, a diferença encontrada nesse experimento foi bastante reduzida quando comparada a experimentos anteriores em nosso laboratório (Bernardes, 2008). Além disso, os animais do grupo I também apresentaram uma frequência maior de respostas na barra que dispensava água, o que poderia levar a cogitar se a diferença encontrada não estaria relacionada ao aumento de atividade motora tipicamente observado nos animais criados em isolamento social (Hall, et al, 1998a). Não há diferença significativa entre os grupos em termos de preferência pelo ET, o que é também indicativo de que o aumento na frequência de respostas dos sujeitos do grupo I possa ser devido a uma maior atividade motora desses animais. Uma diferença importante entre o presente experimento e aqueles realizados anteriormente em nosso laboratório é a idade dos animais quando da introdução do ET: 192 dias de idade, já avançados na fase adulta da vida, quando nos experimentos de Bernardes (2008) foram expostos ao ET pela primeira vez com 79 dias de idade ou 153 dias. É razoável considerar-se que a idade de exposição ao ET seja uma variável de fundamental importância para o seu consumo posterior. De fato, experimentos mostraram que animais criados nos diferentes ambientes de 25 a 185 dias de idade apresentavam diferenças menores em termos de espessura cortical da seção dorso medial do córtex occipital entre os grupos quando comparados a animais criados nos diferentes ambientes dos 25 aos 105 dias de idade (Diamond, et al, 1976). Essa hipótese também pode ser corroborada pelos estudos com humanos que mostram que o consumo de ET na adolescência é variável importante no desenvolvimento de dependência na

idade adulta (Grant & Dawson, 1997; Chouu & Pickering, 1992). E o que é observado ao se comparar os resultados é que houve uma substancial diminuição do consumo de ET (g/kg) apenas para os animais do grupo I quando concorrente à água em relação a experimentos anteriores (Bernardes, 2008).

A revisão da literatura sobre enriquecimentos ambiental e o uso de drogas mostrou-se bastante consistente quando trata de drogas como morfina e anfetamina (Alexander, 1978; Hadaway, 1979; Lu, 2003; Zimmerberg, 1992), no entanto, em relação ao consumo de ET têm sido apresentados dados inconsistentes: alguns métodos produzem aumento do consumo de ET nos animais isolados, outros não encontram diferenças e outros ainda encontram aumento de consumo de ET nos animais criados em ambientes do tipo enriquecido. Uma revisão desses dados e de possíveis diferenças metodológicas importantes já foi realizada na introdução do presente trabalho, no entanto, é de se notar que o consumo de ET parece ser mais sensível a outros fatores que não apenas a presença de estímulos variados no ambiente de criação. É, por exemplo, bastante sensível à presença ou ausência de reforçadores concorrentes, e do tipo, magnitude e esquema de reforço desses reforçadores (Bernardes, 2008), o que fica bastante claro quando a introdução do reforçador concorrente isocalórico ao ET reduz drasticamente tanto a frequência das respostas quanto do consumo de ET, especialmente para os animais do grupo I.

Os animais criados nos diferentes ambientes não apresentaram diferenças quanto aos seus níveis de ansiedade incondicionada quando medida no labirinto em cruz elevada. É importante notar que não houve diferenças quando o teste foi conduzido antes do procedimento de modelagem de pressão à barra (presente trabalho), comparado a quando foi conduzido após todo o procedimento (Bernardes, 2008). Ao contrário do que se esperaria, nesse modelo específico o consumo de ET não está relacionado a

alterações nos níveis de ansiedade que poderiam ser gerados pela criação nos diferentes ambientes (Spanagel, 1995), nem foi “tratada” pelo uso do ET como um ansiolítico (Markou, et al, 1998).

No experimento 2, os animais tinham 84 dias de idade quando da introdução do ET e apresentaram diferenças significativas nas respostas, consumo e preferência por ET na LB1, sendo que os sujeitos do grupo I consumiam e preferiam mais o ET quando comparados aos sujeitos do grupo AE. Mostrando que a idade de introdução do ET é, sim, fator importante no comportamento dos ratos do grupo I de consumo de ET. No entanto, as médias de consumo apresentadas pelo grupo I ainda são substancialmente menores do que em experimentos anteriores: de uma média de 3,4 g de ET por kg de peso corporal (Bernardes, 2008) caiu para 2,18g/kg, quando concorrente à água, enquanto a média de consumo de ET pelo grupo AE pouco se alterou (1,58g/kg e 1,41g/kg, respectivamente). Foi necessária inclusive alteração no protocolo de introdução ao ET, pois os animais não estavam consumindo doses ativas e com a retirada da sacarose o comportamento de pressão à barra estava entrando em extinção. É possível apenas especular sobre as possíveis causas dessa diferença. É possível que nos experimentos anteriores tenha ocorrido uma seleção ao acaso em que houvesse mais animais com preferência por ET no grupo I. Outra possibilidade é a de que, por serem provenientes de diferentes biotérios de criação, talvez sejam mais ou menos sensíveis ao isolamento. Em terceiro lugar, é possível que tenham ocorrido diferenças sutis (mudança de pessoal no biotério, presença de estagiários, alterações nos equipamentos, etc.) entre os procedimentos que tenham sido relevantes para o comportamento dos ratos isolados. De fato, existem evidências de que os animais isolados seriam mais sensíveis a pequenas alterações (Garner, 2005; ILAR, 1997), dificultando a

replicabilidade de resultados. No entanto, com base nos dados, não é possível explicar essas diferenças.

Quando da introdução do concorrente isocalórico, o consumo de ET por ambos os grupos foi reduzido a praticamente zero (0,03g/kg para o grupo AE e 0,19g/kg para o grupo I). Tal resultado também é bastante diferente do observado no Experimento 1, inclusive porque mantém-se significativa a diferença na preferência pela solução de ET entre os grupos, sendo maior para o grupo I. Quando a concentração de MALTO foi reduzida a 1%, não houve mais diferença em termos de preferência pela solução de ET entre os grupos. Quando concorrente a água, os animais do grupo AE apresentaram em média aproximadamente 75% das respostas na barra que dispensava ET, que caíram para 23% quando concorrente a MALTO 1%. Já os animais do grupo I apresentavam aproximadamente 87% das respostas na barra que dispensava ET quando concorrente a água e 24% quando concorrente a MALTO 1%. Houve, portanto, uma queda maior no consumo de ET para os animais do grupo I em comparação ao grupo AE quando da introdução da MALTO 1% como reforçador concorrente, o que pode ser considerado um indicativo de que a presença, ou ausência, de reforçadores no ambiente de criação altera não apenas como os sujeitos se comportam em relação às drogas, mas que a presença de outros reforçadores no momento do consumo da droga é mais importante para aqueles que não dispõem de outros reforçadores na vida. Se pensarmos na Lei da Igualação, a presença de reforçadores concorrentes diminui o valor reforçador que cada um desses reforçadores teria quando apresentados sozinhos, dado que os animais distribuem seu comportamento entre as alternativas. No entanto, a presença de reforçadores no ambiente de criação teoricamente não afetaria essas relações, por não serem concorrentes, ou seja, as respostas que os antecederiam não fariam parte do limite de comportamento que um sujeito poderia exibir no período de tempo de uma sessão

experimental, portanto, não deveriam influenciar o comportamento nesse momento. No entanto, parecem influenciar. É bem descrito na literatura que a criação nos diferentes ambientes altera estruturalmente e funcionalmente o SNC dos sujeitos, altera os organismos. Seria até contra-intuitivo imaginar que não se alterariam as maneiras como os sujeitos fazem escolhas e distribuem o comportamento entre alternativas. Ao se analisar a consistentemente elevada atividade motora dos animais criados em ambiente I, inclusive, é possível analisar que os reforçadores naturais de movimentar-se apresentam um maior valor para esses indivíduos quando comparados aos criados em AE e isso pode ser visto inclusive na sua frequência aumentada de respostas. É possível que os ratos isolados aloquem mais de seu tempo, quando comparados ao do grupo AE, em atividades como apertar a barra em detrimento de dormir ou se coçar, por exemplo, em função não apenas dos reforçadores programados pelo experimentador, mas também dos reforçadores contingentes à atividade motora de apertar a barra, pois a criação nos diferentes ambientes alterou as relações dos valores dos reforçadores. Correr, manipular objetos e escalar são atividades que apresentam reforçadores naturais, dos quais os animais do grupo AE não estão privados, mas os animais do grupo I, sim. Mas quando a preferência pelo ET se iguala entre os grupos quando há a MALTO 1% como concorrente, é possível entender que a criação nos diferentes ambientes alterou também a sensibilidade a outros reforçadores.

A injeção de salina aumentou a frequência de respostas, especialmente dos ratos do grupo AE, pelo ET quando dispensado concorrentemente a água: de média de 288 respostas (75%) os sujeitos do grupo AE passam a média de 342 respostas (87%) pelo ET. Enquanto o grupo I passa de média de 411 respostas (87%) para 435 (82%-aumentaram também as respostas na água em maior proporção), dessa forma, desapareceu a diferença de preferência pelo ET que havia entre os grupos. Caso se

considere a injeção de salina como um evento estressor, é interessante notar a diferença de reação dos animais dos diferentes grupos. Embora a literatura descreva os animais criados em AE como tendo uma habituação mais rápida a eventos estressores agudos (Moncek ET AL, 2004), não parece ter sido o caso no presente experimento. Pelo contrário, o comportamento em função do ET dos animais do grupo AE parece ser mais sensível ao estresse agudo da injeção. Quando o ET é dispensado concorrentemente a MALTO, os grupos não se diferenciam nesse sentido: há aumento na preferência pelo ET para os dois grupos quando da injeção de salina. A preferência por ET do grupo AE passa de 23% para 30%, enquanto a do grupo I passa de 24% para 29%. Então, a presença do reforçador concorrente parece de alguma forma contrabalancear os efeitos do estímulo aversivo injeção em aumentar o valor reforçador do ET, especialmente para os animais do grupo AE.

As doses de ONDA não tiveram efeito sobre o comportamento em função de ET de ambos os grupos (AE e I) quando eram apresentadas concorrentemente a água. Porém, houve um efeito discreto, mas estatisticamente significativo, entre as doses de 0,1mg/kg e 0,4mg/kg quando o ET era disponibilizado concorrentemente a MALTO. Embora as doses utilizadas tenham sido escolhidas com base na literatura em que eram descritas como as mais eficazes em reduzir o consumo de ET (Tomkins ET AL, 1995; McBride ET AL, 2004), o efeito dose-dependente de ONDA é descrito na literatura com outras dosagens: doses menores diminuem o consumo de ET, enquanto doses mais altas aumentam (Tomkins ET AL, 1995). As explicações do motivo desse fenômeno encontram-se ainda no campo das especulações. Acredita-se que sendo um antagonista do receptor 5HT₃ de serotonina a ONDA inibiria o disparo de neurônios dopaminérgicos do VTA e, portanto, a liberação de dopamina no Nac causada pelo ET, o que seria o mecanismo subjacente de seus efeitos reforçadores. O bloqueio desses

efeitos poderia então ter duas consequências opostas: a) diminuiria o valor reforçador do ET, levando a uma diminuição do consumo e b) diminuiria os efeitos hedônicos de ET, levando, portanto, a um aumento de consumo a fim de compensar essa perda, sendo análogo a procedimento de privação ou contingência inicial de extinção. Baseado nos dados disponíveis no momento sobre os mecanismos específicos de ação da ONDA e do ET, não é possível escolher uma hipótese em detrimento da outra. De qualquer modo, a evidência de eficácia da ONDA é bastante contraditória na literatura em geral e isso é corroborado pelo presente experimento, pois a droga só apresentou algum efeito quando havia um reforçador significativo disponível concorrente ao ET e apenas com a introdução desse reforçador a preferência, o consumo de ET já haviam sido reduzidos, em grau de magnitude muito maior do que a redução observada com a droga. Isso poderia indicar que contingências comportamentais seriam mais eficazes em alterar, reduzir, controlar o consumo de ET do que tratamentos farmacológicos. Além disso, os dados apresentados na literatura não mostram alterações no consumo de outras substâncias como água ou soluções de sacarose, no entanto, os resultados do presente experimento mostraram alterações no consumo de MALTO 1% em função da dose de ONDA aplicada. É possível explicar esse fenômeno de ao menos duas maneiras distintas e opostas, sendo a) que a droga na dose de 0,1mg/kg, ao reduzir o valor reforçados do ET, aumenta o valor reforçador de concorrentes disponíveis, ocorrendo então um deslocamento do comportamento para as alternativas disponíveis ou b) que a droga aumentaria o valor reforçador do concorrente ao ET, ou a sensibilidade do organismo ao concorrente e assim diminuiria o consumo deste. Pensando-se nos mecanismos de ação da ONDA, a primeira hipótese seria a mais provável. No entanto, considerando-se que a ONDA não teve efeito quando o reforçador concorrente disponível era a água, a segunda hipótese torna-se mais provável. O efeito dose-

dependente da ONDA também poderia acomodar explicações do tipo: em doses mais baixas, atuaria nos efeitos do ET, enquanto em doses mais altas começaria a interferir em outros reforçadores também, anulando assim seu próprio efeito sobre o consumo de ET. Novamente, são hipóteses que necessitam de outros tipos de dados para que possam ser confirmadas ou refutadas. De qualquer modo, é importante notar que os efeitos da ONDA no consumo de ET parecem ser mais pronunciados quando há um concorrente disponível para o consumo de ET, ou seja, a combinação do tratamento farmacológico com tratamento comportamental seria mais efetiva do que o tratamento farmacológico por si só.

A retirada da restrição alimentar fez com que os animais parassem de trabalhar durante as sessões experimentais. Muitos apenas dormiam nas caixas operantes. Isso pode ser explicado pelo fato de que as sessões eram conduzidas no período claro do ciclo, quando normalmente os ratos têm nível de atividade mais baixo. É interessante que, apesar das baixas taxas de resposta, as diferenças entre os grupos AE e I tenham se mantido, mostrando que essas diferenças são independentes de restrição de alimentos.

Na fase de abstinência, quando o ET foi retirado da solução, os animais aumentaram as respostas na solução de sacarina, tanto com a água como concorrente quanto com a MALTO como concorrente. Isso poderia ser caracterizado como uma situação de extinção, em que retirado o ET e, portanto, mantendo os sujeitos sem os efeitos do álcool, aumentaram a sua frequência de respostas. Assim sendo, se esse esquema fosse mantido por mais sessões, essa frequência de respostas na barra que dispensava sacarina viria a diminuir. Porém, observou-se que na situação concorrente a água a preferência pela solução de sacarina não se alterou em relação à preferência pela solução de ET adoçada (aumentam também as respostas na água), e que ainda houve discreto aumento nessa preferência quando o concorrente era a MALTO1%. Isso

fortalece a hipótese de que, na verdade, o ET tenha por seu sabor e/ou efeitos um componente aversivo, que a retirada do ET da solução tenha tornado-a mais apetitiva para os sujeitos, aumentando sua preferência em relação à solução de MALTO 1%. Alexander e cols. (1979) mostraram que muitas das dificuldades em fazer os animais consumirem doses significativas de morfina deviam-se ao fato de que os ratos evitavam ativamente os efeitos da morfina, e não apenas o sabor amargo da solução. Da mesma forma, a introdução do ET é longa, demorada e trabalhosa por ser feita de forma a contornar a aversão inicial dos sujeitos pela solução e a estabelecer os efeitos do álcool como reforçadores, e nem sempre é bem sucedida. De forma geral, em relação ao ET considera-se que essa aversão seja devida ao sabor do ET (ref). Existe, entretanto, na literatura evidência de que injeções de ET - e, portanto, seus efeitos - pareados com soluções de sacarina produziram aversão condicionada à solução de sacarina (Cappel, 1973).

Os estudos em psicofarmacologia frequentemente utilizam-se de modelos e análises de grupo. Primeiramente, porque o uso de psicofármacos altera os organismos de formas que ainda não são totalmente conhecidas, então, o controle de variáveis intra sujeito é muitas vezes dificultado. Outras contingências não farmacológicas sempre alteram os organismos também, mas muitas são passíveis de reversão - ou já se sabe de que forma alteram. As próprias condições de enriquecimento ambiental e/ou isolamento não podem ser revertidas sem que aumentem ainda mais as variáveis intervenientes, como descrito na introdução, exigindo, portanto, um delineamento experimental de grupo. Além disso, de forma geral, a psicofarmacologia segue o modelo médico e o interesse é no tratamento ou no comportamento de populações (Banaco,) e usa-se do conceito de doença ou disfunção procurando-se uma etiologia comum que preconize um tratamento em comum. Porém, nem sempre as médias populacionais refletem de modo

acurado o comportamento dos indivíduos do grupo, mesmo quando a distribuição da medida é normal. No caso da ONDA, por exemplo, sabe-se que há grande variação individual em relação ao tratamento quando falamos de humanos: a droga tem se mostrado efetiva apenas para alcoolismo de início precoce, no qual há maior influência de variáveis genéticas na suscetibilidade aos efeitos reforçadores do ET (Roache & Johnson, 2004), inclusive tendo sua eficácia associada a apenas a alguns perfis genéticos específicos (Johnson e cols, 2013).

Na situação clínica, trabalha-se com indivíduos, e sabe-se que muitas vezes os tratamentos farmacológicos preconizados não apresentam o efeito esperado. Além disso, dado que as diferenças encontradas entre os grupos AE e I no presente trabalho são bastante reduzidas, torna-se necessária uma análise do comportamento individual dos sujeitos, de forma a analisar como a droga poderia ter atuado de forma diferente para diferentes indivíduos. Primeiramente, é preciso notar que três dos dez sujeitos do grupo I passaram a apresentar comportamento muito agressivo durante o experimento (sujeitos 3I, 6I e 9I), não sendo mais possível manipulá-los sem o uso de luvas especiais de proteção. Nenhum dos animais do grupo AE apresentou tais mudanças de comportamento. Quando os sujeitos foram classificados pelo consumo médio de ET apresentado durante as fases do experimento, apenas o sujeito 9I foi ranqueado como um sujeito com baixa preferência pelo ET. Os outros dois sujeitos ocuparam posições intermediárias. Conclui-se, então, não se tratar de comportamento associado ao consumo de ET. Quando é analisado o comportamento dos animais com maiores médias de consumo, 8I, 1I e 4AE, a droga parece diminuir o consumo e a preferência pelo ET apenas para o sujeito 1I. O consumo de ET do sujeito 8I, inclusive, aumenta quando a dose de 0,1mg/kg e ONDA é aplicada. Quando o ET era apresentado concorrente à MALTO, houve ligeira redução na preferência por ET dos animais 2AE e 4AE com a

dose de 0,1mg/kg. No entanto, o consumo de ET do sujeito 2AE já era muito baixo, não consumindo doses ativas.

Analisando-se o comportamento do sujeito 1I, um grande bebedor e para o qual a droga parece ter algum efeito em reduzir o consumo de ET, vemos que contra a água ele consumia em média 3,24g/kg. Quando da injeção de salina, esse consumo aumentou para 3,62g/kg e foi reduzido pela dose de ONDA de 0,1mg/kg para 3,3g/kg de ET e pela dose de 0,4g/kg para 2,86g/kg. E a sua preferência pela solução de ET passa de 88%, 87% para 74% com a aplicação de ambas doses de droga. Contra a MALTO 1%, seu consumo de ET era de 3,39g/kg, maior que contra a água, e diminuía para 2,84g/kg com a injeção de salina e 2,47g/kg com ONDA 0,1mg/kg, aumentando para 2,60g/kg com ONDA 0,4mg/kg. A frequência relativa de respostas passava de 38,7% para 27,4% com a injeção de salina e 35,3% e 26,1% com as doses de ONDA 0,1mg/kg e 0,4mg/kg, respectivamente. Mesmo com a MALTO 14,8% como concorrente, o sujeito 1I manteve consumo médio de 1,15g/kg de ET, enquanto o consumo dos outros sujeitos, inclusive do grupo I, caiu para menos de 0,5g/kg nessa condição. Observamos, então, que se trata de um sujeito que mantém consumo de ET em níveis importantes, que defende seu consumo de ET mesmo com mudanças importantes nas contingências envolvidas. Para esse sujeito, aparentemente, a dose de 0,1mg/kg de ONDA concorrente a MALTO obteve a maior redução de consumo. É a dose de 4mg/kg nessa situação, entretanto, que apresenta a maior redução na preferência pelo ET, e há também algum efeito da droga no consumo e preferência pelo ET quando concorrente a água. Mesmo para esse sujeito, os dados em relação à eficácia da droga são pouco claros, inclusive pelo efeito das injeções em alterar o consumo. Mostrando que mesmo que a droga na dose de 0,1mg/kg tenha em média mostrado algum efeito em reduzir consumo de ET dos grupos, quando observados o comportamento dos indivíduos esse efeito não é consistente, mesmo ao

analisarmos o comportamento dos sujeitos com maior consumo, que seriam a princípio aqueles para quem a ONDA deveria ter mais efeito.

Embora na literatura venha sendo descrito que a criação com enriquecimento ambiental aumentaria a variabilidade do grupo e, portanto, os desvios da amostra (Ellison, 1987; Hutchinson, 2012), em relação ao consumo de ET não foi o observado no presente experimento. Pelo contrário, os animais do grupo I apresentaram maior variabilidade. Comparando-se os diversos experimentos realizados em nosso laboratório, mesmo havendo mudanças na forma do AE e não tendo havido mudanças no ambiente I, o comportamento dos animais do grupo AE entre os experimentos, com anos de diferença, manteve-se estável, enquanto o comportamento em relação ao ET dos sujeitos do grupo I mudou ao longo dos diversos procedimentos.

Na situação de abstinência, a preferência pela solução de sacarina em relação a água não aparenta ter sido alterada, enquanto que concorrente a MALTO 1% a preferência pela solução de sacarina, quando comparada à preferência pela solução com ET, aumentou para os animais 9I e 2AE, justamente aqueles com o menor consumo médio, indicando que para esses sujeitos há realmente aversão ao ET. Para os sujeitos 1I e 8I, essa preferência diminuiu, indicando que o ET funcionava como reforçador, enquanto para o 4AE não se altera, o que poderia indicar que a presença ou ausência de ET seria indiferente para esse sujeito.

Não houve relação entre os níveis de metabólitos de corticosterona fecal e consumo de ET para os sujeitos do grupo I, mostrando que o consumo de ET não alterou a excreção de corticosterona dos animais. Também o consumo de ET não parece a princípio estar associado a níveis de estresse medidos pela dosagem de corticosterona nesse caso. Infelizmente, devido às características do delineamento experimental utilizado, não foi possível medir os níveis de corticosterona fecal durante a fase de

injeção das drogas. Os níveis de corticosterona fecal basais dos grupos são mais elevados que as medidas durante o procedimento experimental, o que indicaria que a atividade na caixa operante, independentemente da fase do procedimento, reduz a excreção de corticosterona para ambos os grupos. O nível de corticosterona fecal do grupo AE nessa condição é maior do que a média dos sujeitos do grupo I, o que é condizente com a literatura (ref). No entanto, a excreção de metabólitos de corticosterona do grupo AE varia mais em função da fase experimental em comparação com o grupo I, sendo muito menor na fase em que o ET era disponibilizado concorrentemente à água. O nível de corticosterona do grupo AE aumenta muito na fase de abstinência, o que indica que a presença do ET, mesmo para esses animais era, sim, significativa e que a retirada do ET da solução agiu como um estressor importante, ainda que não saibamos para quais os indivíduos especificamente isso ocorreu. A presença de metabólitos de corticosterona nas fezes diminui de maneira importante quando retirada a restrição alimentar após a sessão final da fase de abstinência, quando a solução de sacarina era disponibilizada concorrentemente à de MALTO 1%. Os dados poderiam ser interpretados no sentido de que os animais do grupo AE seriam mais sensíveis às mudanças experimentais. Ao considerar-se o conceito de estresse de Selie (), poderia-se pensar nessa maior variabilidade de excreção de corticosterona como uma maior capacidade de responder a mudanças nas exigências ambientais, o que seria indicativo de organismos mais saudáveis. Dessa forma, os animais do grupo AE apresentariam um tônus ótimo de corticosterona e a produção desse hormônio reagiria de forma adequada às exigências do meio. No entanto, também existem evidências de que o aumento de corticosterona encontrado em ratos e camundongos criados em AE seriam frutos de estresse crônico e que poderiam levar a consequências deletérias para a saúde dos sujeitos. É interessante notar, no entanto, que o sujeito 9I, que apresentava

comportamento extremamente agressivo, foi dos sujeitos com menor excreção de metabólitos de corticosterona nas fezes nas fases de consumo de ET concorrente MALTO (95ng/g) e sem a restrição alimentar (101ng/g). Embora discuta-se que alterações na excreção de corticosterona só seriam detectáveis nas fezes de ratos após eventos de grande magnitude (Siswanto, 2008), o protocolo de extração usado no presente experimento tem sido descrito como tendo maior poder de recuperação de metabólitos não conjugados (Palme, et al,2013) e, portanto, tendo maior capacidade de detectar alterações na excreção. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas que elucidem os mecanismos complexos de excreção e funcionamento de corticosterona em roedores de laboratório em função não apenas dos ambientes de criação, mas também dos procedimentos experimentais utilizados.

Conclusões

O enriquecimento ambiental altera o comportamento de ratos em relação ao ET quando comparados com ratos criados em isolamento. Essas diferenças, no entanto, são menos claras do que estudos anteriores mostravam (Bernardes, 2008) e dependem também de outros fatores ainda não totalmente esclarecidos, como fatores genéticos, idade de introdução do ET, entre outros. Ainda assim, os animais do grupo I tenderam a consumir mais ET quando comparados aos criados em AE. A disponibilidade de reforçadores concorrentes significativos alterou o comportamento dos animais em relação ao ET: diminuiu de forma bastante significativa seu consumo e a preferência pelo ET. A função do consumo da solução de ET varia entre sujeitos sendo, portanto, mais ou menos sujeita a mudanças devido a alterações nas contingências. Da mesma forma, o tratamento com as diferentes doses de ONDA apresentou baixa eficácia no presente modelo, e seus efeitos dependeram tanto de fatores contingenciais (presença ou ausência de reforçadores concorrentes significativos) quanto de fatores individuais dos sujeitos, alterando ou não, de formas diferentes e nas diferentes doses o consumo e a preferência dos sujeitos. Além disso, ao contrário do observado na revisão bibliográfica, a droga alterou também o comportamento dos sujeitos em relação ao reforçador concorrente. É importante notar que houve efeito das injeções no consumo de ET, especialmente para os sujeitos do grupo AE, o que confunde os dados do tratamento com as diferentes doses de ONDA. A criação nos diferentes ambientes não alterou os níveis de ansiedade incondicionada como medidos pelo labirinto em cruz elevada, no entanto alteraram os perfis de excreção de metabólitos fecais de corticosterona, e os animais criados em AE parecem ter sido mais sensíveis às diferentes contingências experimentais, mostrando que a criação nos diferentes ambientes altera a forma como o

eixo HPA responde a alterações do ambiente. No entanto os níveis de corticosterona fecal não estavam relacionados a maior ou menor consumo de ET.

O uso de drogas é entendido como um comportamento de escolha e mesmo que o álcool e outras drogas apresentem algumas características diferentes de outros reforçadores, como menor elasticidade de sua demanda (Bernardes, 2008; Heyman, 1996), ainda assim os organismos alteram seu consumo em função de alterações nas contingências: quando o custo da droga aumenta muito, quando há disponibilidade de reforçadores concorrentes de magnitude significativa, entre outras, devendo dessa forma ser visto, não como um transtorno, ou doença, mas como situações peculiares que são parte do funcionamento normal do organismo. O consumo de drogas é regulado pelas mesmas leis que controlam o comportamento em geral (Heyman, 2009). É importante notar o comportamento de uso de drogas, mesmo em ratos, ainda que topograficamente similar, pode ser funcionalmente distinto, sendo, portanto, necessárias análises individuais, para além do conceito de uma única etiologia.

Referências Bibliográficas

- Adinoff, B., Risher-Flowers, D., De Jong, J., Ravitz, B., Bone, G., Nutt, D., Roehrich, L., et al. (1991). Disturbances of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning during ethanol withdrawal in six men. *American Journal of Psychiatry*, 148(8), 1023-1025.
- Alexander, B. K., Coombs, R. B., & Hadaway, P. F. (1978). The effect of housing and gender on morphine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 58(2), 175-179.
- APA. (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (Forth ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Baumans, V. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR Journal*, 46(2), 162-170.
- Baum, W. M., & Rachlin, H. C. (1969). Choice as time allocation. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 12(6), 861-874. doi:10.1901/jeab.1969.12-861
- Baum, W. M. (1974). On two types of deviation from the matching law: bias and undermatching. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 22(1), 231-242. doi:10.1901/jeab.1974.22-231
- Bayne, K. (2005). Potential for unintended consequences of environmental enrichment for laboratory animals and research results. *ILAR Journal*, 46(2), 129-139.
- Bernardes, A. M. T. (2008). *Efeito de enriquecimento ambiental na auto-administração oral de álcool em ratos*. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
- Billitti, J. E., Lasley, B. L., & Wilson, B. W. (1998). Development and Validation of a Fecal Testosterone Biomarker in *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus*. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1023 -1028.
- Buonopane, A. & Petrakis, Ismene L. (2005). Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorders. *Substance Use & Misuse*, 40 (13), 2001- 2020
- Catania, A. (1999). *Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição* (D. d. G. d. Souza, Trans. 4 ed.). Porto Alegre: Artmed Editora.
- Chou, S. P., & Pickering, R. P. (1992). Early onset of drinking as a risk factor for lifetime alcohol-related problems. *British Journal of Addiction*, 87(8), 1199-1204. doi:10.1111/j.1360-0443.1992.tb02008.x
- Cicero, T. J., Bernstein, D., & Badger, T. M. (1978). Effects of Acute Alcohol Administration on Reproductive Endocrinology in the Male Rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2(3), 249-254.
- 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 and Experimental Research*, 25(10), 1414-1419.
- 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.
- Chelini, M.-O., Otta, E., Yamakita, C., & Palme, R. (2010). Sex differences in the excretion of fecal glucocorticoid metabolites in the Syrian hamster. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(6), 919-925-925.

- Crabbe, J. C., Wahlsten, D., & Dudek, B. C. (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 284(5420), 1670-1672.
- Czachowski, C. L., & Samson, H. H. (1999). Breakpoint determination and ethanol self-administration using an across-session progressive ratio procedure in the rat. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 23(10), 1580-1586.
- Da Silva, G. E., Ramos, A., & Takahashi, R. N. (2004). Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(10), 1511-1517.
- Dahlqvist, P., Ronnback, A., Risedal, A., Nergardh, R., Johansson, I. M., Seckl, J. R., et al. (2003). Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats. *Neuroscience*, 119(3), 643-652.
- Deehan, G. A., Jr., Cain, M. E., & Kiefer, S. W. (2007). Differential rearing conditions alter operant responding for ethanol in outbred rats. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 31(10), 1692-1698.
- DeTurck, K. H., & Pohorecky, L. A. (1987). Ethanol sensitivity in rats: effect of prenatal stress. *Physiology & Behavior*, 40(3), 407-410.
- Diamond, M. C., Ingham, C. A., Johnson, R. E., Bennett, E. L., & Rosenzweig, M. R. (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *Journal of Neurobiology*, 7(1), 75-85. doi:10.1002/neu.480070108
- Ehlers, C. L., Walker, B. M., Pian, J. P., Roth, J. L., & Slawecki, C. J. (2007). Increased alcohol drinking in isolate-housed alcohol-preferring rats. *Behavioral Neuroscience*, 121(1), 111-119.
- Ellison, G. (1987). Stress and alcohol intake: the socio-pharmacological approach. *Physiology & Behavior*, 40(3), 387-392.
- Esel, E., Sofuoglu, S., Aslan, S. S., Kula, M., Yabanoglu, I., & Turan, M. T. (2001). Plasma levels of beta-endorphin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol during early and late alcohol withdrawal. *Alcohol and Alcoholism*, 36(6), 572 - 576.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1481-1489.
- Fernandez-Teruel, A., Driscoll, P., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A., & Escorihuela, R. M. (2002). Enduring effects of environmental enrichment on novelty seeking, saccharin and ethanol intake in two rat lines (RHA/Verh and RLA/Verh) differing in incentive-seeking behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 225-231.
- Ferster, C., & Skinner, B. (1957). *Schedules of reinforcement*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Forquer, M. R., Hashimoto, J. G., Roberts, M. L., & Wiren, K. M. (2011). Elevated testosterone in females reveals a robust sex difference in altered androgen levels during chronic alcohol withdrawal. *Alcohol*, 45(2), 161-171.
- Fowler, S. C., Johnson, J. S., Kallman, M. J., Liou, J. R., Wilson, M. C., & Hikal, A. H. (1993). In a drug discrimination procedure isolation-reared rats generalize to lower doses of cocaine and amphetamine than rats reared in an enriched environment. *Psychopharmacology*, 110(1-2), 115-118.
- Garcia-Mijares, M., & Silva, M. (2006). Dependência de Drogas. *Psicologia USP*, 17(4), 213-240.

- Garner, J. P. (2005). Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR Journal*, 46(2), 106-117.
- Grant, B. F., & Dawson, D. A. (1997). Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the national longitudinal alcohol epidemiologic survey. *Journal of Substance Abuse*, 9(0), 103-110. doi:doi: 10.1016/S0899-3289(97)90009-2
- Goudie, A. J. (1991). Animal Models of Drug Abuse and Dependence. In P. Willner (Ed.), *Behavioural Models in Psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 453-484). Cambridge: Cambridge University Press.
- Hadaway, P. F., Alexander, B. K., Coombs, R. B., & Beyerstein, B. (1979). The effect of housing and gender on preference for morphine-sucrose solutions in rats. *Psychopharmacology*, 66(1), 87-91.
- Hall, F. S., Huang, S., Fong, G. W., Pert, A., & Linnoila, M. (1998a). Effects of isolation-rearing on locomotion, anxiety and responses to ethanol in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology*, 139(3), 203-209.
- Hall, F. S., Huang, S., Fong, G. W., Pert, A., & Linnoila, M. (1998b). Effects of isolation-rearing on voluntary consumption of ethanol, sucrose and saccharin solutions in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology*, 139(3), 210-216.
- Hartnoll, R. (1991). The relevance of behavioural models of drug abuse and dependence liabilities to the understanding of drug misuse in humans. In P. Willner (Ed.), *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 503-519). Cambridge: Cambridge University Press.
- Herrnstein, R. J. (1961). Relative and absolute strength of response as a function of frequency of reinforcement,. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 4(3), 267-272. doi:10.1901/jeab.1961.4-267
- Herrnstein, R., & Prelec, D. (1992). A Theory of Addiction. In G. Loewenstein & J. Elster (Eds.), *Choice Over Time* (pp. 331-360). New York: Russell Sage Foundation.
- Heyman, G. M. (1996). Resolving the contradictions of addiction. *Behavioral and Brain Sciences*, 19(4), 561-610.
- Heyman, G. M., Gendel, K., & Goodman, J. (1999). Inelastic demand for alcohol in rats. *Psychopharmacology*, 144(3), 213-219.
- Heyman, G. M. (2009). *Addiction: a disorder of choice* (1^o ed.). Cambridge, Massachusetts, and London, England: Harvard University Press.
- Hutchinson, E., Avery, A., & Vandewoude, S. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR Journal*, 46(2), 148-161.
- Ida, Y., Tsujimaru, S., Nakamaura, K., Shirao, I., Mukasa, H., Egami, H., & Nakazawa, Y. (1992). Effects of acute and repeated alcohol ingestion on hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal functioning in normal males. *Drug and Alcohol Dependence*, 31(1), 57-64.
- ILAR. (1997). *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2 ed.). Washington, D.C.: National Academy Press.
- Joels, M. & Krugers, H.J. (2007). LTP after stress: up or down? *Neural Plasticity*, 93202, 14-6.
- Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1403-1413.

- Kalueff, A. V., Wheaton, M., & Murphy, D. L. (2007). What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 179(1), 1-18.
- Kampov-Polevoy, A. B., Kasheffskaya, O. P., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., Viglinskaya, I. V., Badistov, B. A., et al. (1996). Pain sensitivity and saccharin intake in alcohol-preferring and -nonpreferring rat strains. *Physiology & Behavior*, 59(4-5), 683-688.
- King, A. C., Errico, A. L., & Parsons, O. A. (1995). Eysenck's personality dimensions and sex steroids in male abstinent alcoholics and nonalcoholics: an exploratory study. *Biological Psychology*, 39(2-3), 103-113.
- Kranzler, H. R., Pierucci-Lagha, A., Feinn, R., & Hernandez-Avila, C. (2003). Effects of Ondansetron in Early- Versus Late-Onset Alcoholics: A Prospective, Open-Label Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 27(7), 1150-1155. doi:10.1097/01.ALC.0000075547.77464.76
- Lepschy, M., Touma, C., Hruby, R., & Palme, R. (2007). Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. *Laboratory Animals*, 41(3), 372-387.
- Lu, L., Shepard, J. D., Scott Hall, F., & Shaham, Y. (2003). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(5), 457-491.
- Markham, J. A., & Greenough, W. T. (2004). Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biology*, 1(04), 351-363. doi:10.1017/S1740925X05000219
- Markou, A., Kosten, T. R., & Koob, G. F. (1998). Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, 18(3), 135-174.
- McBride W. J., Lovinger, D. M., Machu, T., Thielen, R. J., Rodd, Z. A., Murphy, J. M., et al. (2004). Serotonin-3 Receptors in the Actions of Alcohol, Alcohol Reinforcement, and Alcoholism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(2), 257-267.
- McKim, W. (2006). *Drugs and Behavior* (6th Edition ed.). New Jersey: Prentice Hall.
- Meisch, R. A. (2001). Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. *Alcohol*, 24(2), 117-128.
- Mendelson, J. H., Mello, N. K., & Ellingboe, J. (1977). Effects of acute alcohol intake on pituitary-gonadal hormones in normal human males. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 202(3), 676 -682
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B. B., & Jezova, D. (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(5), 423-431.
- Møllgaard, K., Diamond, M. C., Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Lindner, B. (1971). Quantitative Synaptic Changes With Differential Experience In Rat Brain. *Int J Neurosci*, 2(3), 113-127. doi:10.3109/00207457109148764
- Munro C. J., Lasley B. L. (1988). Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog Clin Biol Res*; 285, 289–329.
- Myrick, H., Anton, R. F., Li, X., Henderson, S., Randall, P. K., & Voronin, K. (2008). Effect of Naltrexone and Ondansetron on Alcohol Cue-Induced Activation of the Ventral Striatum in Alcohol-Dependent People. *Archives of General Psychiatry*, 65(4), 466-475. doi:10.1001/archpsyc.65.4.466

- Olsson, I. A., & Dahlborn, K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Laboratory Animals*, 36(3), 243-270.
- Pham, T. M., Winblad, B., Granholm, A. C., & Mohammed, A. H. (2002). Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 167-175.
- Palme, R. (2005). Measuring Fecal Steroids: Guidelines for Practical Application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 75-80. doi:10.1196/annals.1343.007
- Palme, R., et al. "Steroid extraction: get the best out of faecal samples." *Wiener Tierärztliche Monatsschrift—Veterinary Medicine Austria* 100 (2013): 238-246.
- Persky, H., O'Brien, C., Fine, E., Howard, W., Khan, M., & Beck, R. (1977). The effect of alcohol and smoking on testosterone function and aggression in chronic alcoholics. *American Journal of Psychiatry*, 134(6), 621-625.
- Pickworth, W. B., & Fant, R. V. (1998). Endocrine effects of nicotine administration, tobacco and other drug withdrawal in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 23(2), 131-141.
- Pohorecky, L. A. (1987). Workshop on the Interaction of Ethanol and Stress. Helsinki, Finland, June 13, 1986. Proceedings. *Physiology & Behavior*, 40(3), 373-410.
- Porrino, L. J., Whitlow, C. T., & Samson, H. H. (1998). Effects of the self-administration of ethanol and ethanol/sucrose on rates of local cerebral glucose utilization in rats. *Brain Research*, 791(1-2), 18-26.
- Richardson, N. R., & Roberts, D. C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, 66(1), 1-11.
- Robins, L. N., Helzer, J. E., & Davis, D. H. (1975). Narcotic use in southeast Asia and afterward. An interview study of 898 Vietnam returnees. *Archives of General Psychiatry*, 32(8), 955-961.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction*, 96(1), 103-114.
- Rockman, G. E., & Gibson, J. E. (1992). Effects of duration and timing of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 41(4), 689-693.
- Rockman, G. E., Gibson, J. E., & Benarroch, A. (1989). Effects of environmental enrichment on voluntary ethanol intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 34(3), 487-490.
- Rockman, G. E., Hall, A. M., Markert, L. E., & Glavin, G. B. (1988). Influence of rearing conditions on voluntary ethanol intake and response to stress in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 49(2), 184-191.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1993). Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiology & Behavior*, 54(4), 729-736.
- Rosenzweig, M. R., & Bennett, E. L. (1969). Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. *Developmental Psychobiology*, 2(2), 87-95.
- Rosenzweig, M. R., & Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78(1), 57-65.
- Rösner, S., Leucht, S., Leher, P., & Soyka, M. (2008). Acamprosate supports abstinence, Naltrexone prevents excessive drinking: evidence from a meta-

- analysis with unreported outcomes. *Journal of Psychopharmacology*, 22(1), 11 - 23. doi:10.1177/0269881107078308
- Rosnow, R. L., & Rosenthal, R. (1989). Statistical procedures and the justification of knowledge in psychological science. *American Psychologist*, 44, 1276-1284.
- Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., & Chapillon, P. (2001). Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology & Behavior*, 74(3), 313-320.
- Samson, H. H., Pfeffer, A. O., & Tolliver, G. A. (1988). Oral ethanol self-administration in rats: models of alcohol-seeking behavior. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 12(5), 591-598.
- Schenk, S., Gorman, K., & Amit, Z. (1990). Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats. *Alcohol*, 7(4), 321-326.
- Selye, H. (1974). *Stress without distress* (1 ed.). Philadelphia & New York: J. B. Lippincott Company.
- Siegel, S., Baptista, M. A. S., Kim, J.A., McDonald R. V., Weise-Kelly, L. (2000). Pavlovian Psychopharmacology: The Associative Basis of Tolerance. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 8(3), 276-293
- Silva, M. T. A. (1997). Modelos animais de ansiedade. In D. Zamignani (Ed.), *Sobre comportamento e cognição* (Vol. III, pp. 91-96). Santo André: ARBytes.
- Silva, M. T. A., Barros, R. S., & de Magalhaes, M. P. (1994). Use of marijuana and other drugs by college students of Sao Paulo, Brazil. *International Journal of the Addictions*, 29(8), 1045-1056.
- Souza, V. B. (2002). *Efeitos do estresse psicossocial crônico e do enriquecimento ambiental em sagüis (Callithrix penicillata): Um estudo comportamental, fisiológico e farmacológico*. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Spanagel, R., Montkowski, A., Allingham, K., Stohr, T., Shoaib, M., Holsboer, F., et al. (1995). Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 122(4), 369-373.
- Stafford, D., LeSage, M. G., & Glowa, J. R. (1998). Progressive-ratio schedules of drug delivery in the analysis of drug self-administration: a review. *Psychopharmacology*, 139(3), 169-184.
- Steele, C. M., & Josephs, R. A. (1990). Alcohol myopia. Its prized and dangerous effects. *American Psychologist*, 45(8), 921-933.
- Suzdak, P. D., Schwartz, R. D., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1986). Ethanol stimulates gamma-aminobutyric acid receptor-mediated chloride transport in rat brain synaptoneurosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 4071 -4075.
- Swift, R. M., Davidson, D., Whelihan, W., & Kuznetsov, O. (1996). Ondansetron alters human alcohol intoxication. *Biological Psychiatry*, 40(6), 514-521. doi:10.1016/0006-3223(95)00432-7
- Thorsell, A., Slawecki, C. J., Khoury, A., Mathe, A. A., & Ehlers, C. L. (2005). Effect of social isolation on ethanol consumption and substance P/neurokinin expression in Wistar rats. *Alcohol*, 36(2), 91-97.
- Touma, C., Palme, R., & Sachser, N. (2004). Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior*, 45(1), 10-22.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., & Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology*, 130(3), 267-278.

- Vaillant, G. E., & Milofsky, E. S. (1982). The etiology of alcoholism: a prospective viewpoint. *American Psychologist*, 37(5), 494-503.
- Weinberg, J., Taylor, A. N., & Gianoulakis, C. (1996). Fetal ethanol exposure: hypothalamic-pituitary-adrenal and beta-endorphin responses to repeated stress. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 20(1), 122-131.
- Weiss, F., Martin-Fardon, R., Ciccocioppo, R., Kerr, T. M., Smith, D. L., & Ben-Shahar, O. (2001). Enduring resistance to extinction of cocaine-seeking behavior induced by drug-related cues. *Neuropsychopharmacology*, 25(3), 361-372.
- WHO. (2002). *Alcohol in developing societies : a public health approach*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134(4), 319-329.
- Wish, E. D., Robins, L. N., Hesselbrock, M., & Helzer, J. E. (1979). The course of alcohol problems in Vietnam veterans. *Currents in Alcoholism*, 6, 239-256.
- Wolffgramm, J. (1990). Free choice ethanol intake of laboratory rats under different social conditions. *Psychopharmacology*, 101(2), 233-239.
- Wurbel, H. (2001). Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends in Neurosciences*, 24(4), 207-211.
- Zimmerberg, B., & Brett, M. B. (1992). Effects of early environmental experience on self-administration of amphetamine and barbitol. *Psychopharmacology*, 106(4), 474-478.