



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA EXPERIMENTAL

LABORATÓRIO DE PSICOFARMACOLOGIA

YULLA CHRISTOFFERSEN KNAUS

Efeitos do bromazepam sobre o desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos a treinos em esquemas de Razão Progressiva e Segunda Ordem

São Paulo

2016

YULLA CHRISTOFFERSEN KNAUS

Efeitos do bromazepam sobre o desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos a treinos em esquemas de Razão Progressiva e Segunda Ordem

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação de Psicologia Experimental da Universidade de São Paulo como pré-requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof. Dr. Miriam Garcia-Mijares

SÃO PAULO

2016

DADOS CATALOGRÁFICOS

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE 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

Knaus, Yulla Christoffersen.

Efeitos do bromazepam sobre o desempenho de *Rattus Norvegicus* submetidos a treinos em esquemas de razão progressiva e segunda ordem / Yulla Christoffersen Knaus; orientadora Miriam Garcia Mijares. -- São Paulo, 2016.

66 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Bromazepam 2. Psicofarmacologia 3. Razão progressiva 4. Esquema de segunda ordem I. Título.

RC564

Nome: Yulla Christoffersen Knaus

Título: Efeitos do bromazepam sobre o desempenho de *Rattus Norvegicus* submetidos a treinos em esquemas de Razão Progressiva e Segunda Ordem

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Psicologia Aprovado em:

Aprovado em: 29/04/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Miriam Garcia-Mijares (Orientadora)

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. Gerson Aparecido Yukio Tomanari

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernanda Libardi Galesi

Instituição: Particular

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e amor recebido.

A todos os professores que estiveram envolvidos em minha formação desde o início da graduação e me incentivaram a perseguir o caminho que aqui me trouxe. Em especial, à professora Miriam Garcia-Mijares por confiar e acreditar em mim e permitir o desenvolvimento desta pesquisa em seu laboratório, assim como o meu desenvolvimento como pessoa e pesquisadora com sua ajuda.

A todos amigos que me apoiaram, entreteram durante longas horas de coleta e me ouviram reclamar durante esse tempo. Em especial às vixens e aos estranhos.

A todos colegas de trabalho, não menos amigos, pelo ombro amigo, auxílio estatístico e psicológico e muitas xícaras de café.

À USP, onde passei a melhor parte da última década de minha vida, e que me ensinou muito mais do que pode ser aprendido dentro de salas de aula.

À Hernando pelo carinho, companhia, aventuras e gatos proporcionados.

Por último, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Knaus, Y. C. (2016). Efeitos do bromazepam sobre o desempenho de *Rattus Norvegicus* submetidos a treinos em esquemas de Razão Progressiva e Segunda Ordem. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Benzodiazepínicos são as drogas lícitas mais vendidas no Brasil - cerca de 50 milhões de brasileiros fazem uso diário desse tipo de droga. É clara a importância de se conhecer os efeitos que essas drogas podem ter sobre o comportamento. Existem diversas lacunas no conhecimento de como afetam diferentes aspectos do comportamento operante, entretanto. Especificamente, o efeito do tratamento sobre o responder por reforçadores condicionados tem sido uma área pouco explorada. O presente estudo se propôs a investigar os efeitos do tratamento com bromazepam sobre o responder por um estímulo condicionado e um incondicionado, em dois esquemas complementares, razão progressiva e segunda ordem. Foram conduzidos três experimentos. Experimento I: 9 ratas de aproximadamente 9 meses de idade foram submetidas à um esquema de razão progressiva, tendo um composto de luz (LUZ) e solução de sacarose (SAC) como consequência; uma vez obtida uma linha de base foi iniciado tratamento com 1 mg/kg de bromazepam em 4 dos sujeitos (BRO) e salina (VEI) nos demais. Após 28 dias, foi removida SAC. Após 8 dias, foi removida também LUZ. Ocorreram então 5 sessões de extinção. Foi observada uma redução no responder durante o tratamento em BRO. O tratamento não apresentou efeitos adicionais durante a fase de remoção das consequências. Experimento II: replicação do I utilizando 18 machos de aproximadamente 3 meses de idade e com uma entrefase de adaptação ao procedimento de injeção. O tratamento levou ao aumento do responder em BRO ($F_{2,23}=8,13$; $p=0,001$), porém não trouxe diferenças após a remoção das consequências. Experimento III: 20 ratos machos de 3 meses de idade foram submetidos à duas fases experimentais: manutenção (no qual, por quatro dias, eram expostos à esquemas de segunda ordem de Razão/Intervalo com a duração do intervalo crescente a cada sessão (FI 2min (FR5:luz); FI 5min(FR5:luz); FI10min(FR5:luz) e FI20min(FR5:luz), e teste (T1 FI20min(FR5luz)), T2 FR5 e T3 FI20min). As fases de manutenção tinham por objetivo estabelecer e fortalecer a relação LUZ/SAC. Responder para VEI se mostrou estável nas fases teste, enquanto foi observada uma redução em T3 para BRO. Os resultados indicam que BRO teve efeito de modular o responder pelo reforçador incondicionado em todas as situações experimentais, interagindo com o esquema vigente e outras variáveis experimentais como sexo. Não foi observado, entretanto, efeito específico sobre a eficácia de reforçadores condicionados.

Palavras chave: Bromazepam; Psicofarmacologia; Razão progressiva; Esquema de segunda ordem.

ABSTRACT

Knaus, Y. C. (2016). Effects of the drug bromazepam on the performance of rats (*Rattus Norvegicus*) trained in Progressive Ratio and Second Order schedules. Dissertação de Mestrado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Benzodiazepines are the most sold of legal drugs in Brazil – about 50 million Brazilians use this kind of drug on a daily basis. The importance of knowing the effects of these drugs on behavior is clear. There are several gaps in the knowledge of these drugs affect operant behavior, however. Specifically, the effect of treatment on the responding for conditioned reinforcements is an area that has seldom been investigated. The present study proposed to investigate the effects of bromazepam treatment on the responding for a conditioned and an unconditioned stimulus, in two complementary schedules, namely, progressive ratio and second order. Three experiments were held. Experiment I: 9 female rats of approximately 9 months of age underwent a progressive ratio schedule, with a sucrose solution (SUC) and a light presentation (LIGHT) as concomitant consequences. Once baseline was established, treatment with 1mg/kg bromazepam was started for 4 subjects (BRO). The remaining received saline (VEI). After 29 days, SAC was removed. After 8 days, LIGHT was also removed. Then 5 sessions of extinction took place. Lower responding was observed in BRO. Treatment did not further effect behavior in the remaining experimental stages (consequence removal). Experiment II: pilot replication using 18 male rats and including a stage of habituation to the injection procedure. Treatment incurred in the increase of responding for BRO ($F_{2,23}=8.13$; $p=0.001$), but had no further effects on the subsequent stages. Experiment III: 20 male rats underwent two experimental stages: maintenance (for four days the animal underwent second order schedules composed of a Ratio and an Interval component, in which the interval increased with each session (FI 2min(FR5:light); FI 5min(FR5light); FI10min(FR5light) E FI20min(FR5light) and test (T1 FI20min(FR5light)), T2 FR5 and T3 FI20min). Maintenance stages were intended to stablish and strengthen the LIGHT/SUC relation. VEI responded in a stable manner in all test stages, while BRO showed a reduction in responding in T3. Overall results indicate BRO was able to modulate responding for the unconditioned reinforcer in all experimental situations, interacting with other variables such as schedule and sex. No particular effect was found on the efficacy of the conditioned stimulus, however.

Keywords: Bromazepam; behavioral pharmacology; progressive ratio; second order schedules.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Efeitos de Benzodiazepínicos sobre o comportamento	1
1.3 Efeito de benzodiazepínicos sobre respostas mantidas por reforçadores condicionados.....	9
1.4 Justificativa e Objetivo.....	12
2 EXPERIMENTO I Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados, conforme medido por um esquema de razão progressiva, em ratas fêmeas.....	13
2.1 MÉTODO	13
2.1.1 Sujeitos.....	13
2.1.2 Equipamento.....	13
2.1.3 Preparação farmacológica	14
2.1.4 Medição do ciclo estral.....	14
2.2 PROCEDIMENTO	14
2.2.1 Fase I – Treino de pressão de barra (Modelagem).....	14
2.2.2 Fase II – Razão Progressiva (Linha de base - LB)	15
2.2.3 Fase III – Início da administração de drogas (Tratamento).....	15
2.2.4 IV - Remoção do Reforçador Incondicionado	16
2.2.5 V - Remoção do Reforçador Condicionado (Extinção)	16
2.2.6 Controle do ciclo estral.....	16
2.2.7 Análise de dados.....	17
2.3 RESULTADOS.....	18
2.3.1 Fase III - Efeito da administração aguda e crônica de bromazepam sobre o responder no esquema de RP (incondicionado + condicionado).....	18
2.3.2 Fases IV & V – Efeito do tratamento com bromazepam sobre o responder mantido pelo reforçador condicionado e pela sua retirada	18
2.3.3 Controle Estral	20
3 EXPERIMENTO II Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados, conforme medido por um esquema de razão progressiva.....	24
3.1 MÉTODO	24
3.1.1 Sujeitos.....	24
3.1.2 Equipamento.....	24
3.1.3 Preparação farmacológica	24
3.2 PROCEDIMENTO	25
3.2.1 Análise de dados.....	25

3.3 RESULTADOS.....	26
3.3.1 Fase III - Efeito da administração aguda e crônica de bromazepam sobre o responder no esquema de RP (incondicionado + condicionado).....	26
3.3.2 Fases IV & V – Efeito do tratamento com bromazepam sobre o responder mantido pelo reforçador condicionado e pela sua retirada.....	27
3.4 DISCUSSÃO.....	30
4 EXPERIMENTO III - Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados da resposta treinada sob um esquema de segunda ordem.	32
4.1 MÉTODO.....	31
4.1.1 Sujeitos.....	32
4.1.2 Equipamento.....	32
4.1.3 Preparação farmacológica	33
4.2 PROCEDIMENTO	33
4.2.1 I - Modelagem	33
4.2.2 II – Experimental	33
4.2.3 Análise de dados.....	35
4.3 RESULTADOS.....	36
4.3.1 Teste I – Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelos reforçadores condicionado e incondicionado	36
4.3.2 Teste II – Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelo reforçador condicionado.	37
4.3.3 Teste III - Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelo reforçador incondicionado.....	37
4.3.4 Comparação entre as condições.....	38
4.4 DISCUSSÃO.....	42
5 CONCLUSÃO.....	44
6 REFERÊNCIAS	47
7 ANEXO A – Tabela de exigências gerada pela fórmula de Richardson e Roberts (1996), utilizada no esquema de razão progressiva	52
8 ANEXO B – Resultados e discussão parcial dos dados obtidos no experimento I, incluindo tratamentos com a droga citalopram e o composto citalopram e bromazepam .	53

No Brasil a classe de drogas controladas mais vendidas é a dos ansiolíticos, especialmente os do tipo benzodiazepínico (ANVISA, 2013). De acordo com a Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina (2008) em torno de 50 milhões de pessoas fazem uso diário de benzodiazepínicos, seja esse uso medicinal ou recreativo. A droga bromazepam se encontra no topo da lista dos mais vendidos, junto com drogas como clonazepam e alprazolam (ANVISA, 2012). Três usos principais de benzodiazepínicos podem ser identificados, embora sejam prescritas para muitos outros, com diferentes graus de sucesso: o controle de quadros ansiosos (pânico, ansiedade e similares), o uso concomitante com o tratamento para depressão e para o tratamento de insônia (Dell'ossoa & Laderb, 2013)

Benzodiazepínicos têm ação no sistema nervoso central, ou seja, são capazes de passar a barreira hematoencefálica. São conhecidos três tipos de receptores benzodiazepínicos no sistema nervoso central: BZD1, BZD2 e BZD3. Os receptores BZD1 e BZD2 estão associados a receptores gabaérgicos, mais especificamente, à GABAA. Os receptores GABAA se encontram predominantemente na pós-sinapse e estão em maior densidade no córtex frontal e na camada granulada do cerebelo. Sua função é inibitória: estão ligados à abertura de canais iônicos de Cl⁻, gerando, quando ativados, hiperpolarização da célula devido ao influxo de Cl⁻. A hiperpolarização da célula, por sua vez, dificulta a despolarização do neurônio e, portanto, a ocorrência do potencial de ação. A abertura dos receptores benzodiazepínicos pelos ansiolíticos aumenta a afinidade de GABA pelo sítio de ligação, facilitando a sua ativação. Dessa maneira, benzodiazepínicos facilitam uma ativação inibitória e que leva a sintomas como sonolência, sedação, entre outros (McKim, 2007).

Alterações no funcionamento do Sistema Nervoso Central, como as efetuadas por benzodiazepínicos, podem afetar o comportamento de quem as ingere de diversas maneiras. Apesar da frequência com a qual essas drogas são prescritas e utilizadas, ainda existem muitas lacunas no conhecimento em relação aos seus efeitos sobre o comportamento, especialmente aqueles que são mantidos por reforço positivo.

Efeitos de Benzodiazepínicos sobre o comportamento

Diversos experimentos com humanos foram desenvolvidos sobre os efeitos dos benzodiazepínicos sobre o organismo. McKim (2007) faz uma revisão de alguns efeitos descritos dessas drogas. Em linhas gerais, podem ser apontados principais efeitos: sobre

o sono (sedação, menor latência para o dormir, menor porcentagem de tempo em REM e estágios 3 e 4); sobre percepções subjetivas (aumento na euforia, fadiga, “liking”, redução do vigor e ansiedade); sobre processos fisiológicos (aumento de apetite, relaxamento muscular); sobre a performance (déficits em memória, atenção, reação e funcionamento visual), entre outros.

De especial interesse são os possíveis efeitos dos benzodiazepínicos sobre o comportamento operante. Para que esse tipo de análise fosse possível, diversos protocolos foram desenvolvidos, focando em diferentes aspectos do comportamento. Em linhas gerais, esses protocolos podem ser divididos em três tipos, de acordo com o momento de administração da droga. A droga pode ser usada como consequência, sendo apresentada dentro da sessão experimental, após uma resposta alvo ser emitida – estudos de drug seeking e autoadministração são exemplos desse delineamento. A droga também pode ser administrada antes do começo da sessão, de maneira que o animal responda durante a sessão experimental enquanto sobre efeito da droga. Uma terceira opção é a administração da droga após a sessão; essas pesquisas geralmente têm o objetivo de avaliar o efeito da droga sobre a consolidação de memórias resultantes do treino. O segundo tipo de procedimento, administração da droga antes da sessão, é o foco desta pesquisa e por esse motivo será descrito a continuação com maior detalhe.

Para avaliar como a administração de uma droga afeta um comportamento posterior é necessária uma resposta alvo, que será utilizada como medida, e uma maneira de controlar quanto essa resposta é afetada pelo tratamento farmacológico – para tal, pode ser utilizado um grupo controle, ser feita linha de base sem tratamento ou ambos. O comportamento alvo é escolhido de acordo com a faceta do comportamento a ser estudada. Nos estudos sobre os efeitos de benzodiazepínicos sobre o comportamento, muito tem-se estudado contingências de reforçamento negativo, extinção e punição, em função das propriedades antiaversivas dessa classe de drogas (Dantzer, 1977b), assim como por esses processos estarem associados a estados ansiosos. Relativamente poucos estudos têm se preocupado com o efeito dessas drogas sobre respostas mantidas por reforço positivo, apesar de essas serem uma parte considerável do comportamento de qualquer indivíduo, mesmo os estudos existentes apresentando resultados relevantes para o tratamento de seres humanos.

Dantzer (1977b), em revisão, descreve aumento de consumo livre com tratamento com benzodiazepínicos, tanto de substância de alta quanto baixa palatabilidade. Diazepam, clordiazepóxido, nitrazepam e oxazepam são capazes de aumentar o consumo de um

alimento palatável (leite adoçado), mesmo em animais saciados. Clordiazepóxido também aumentou o consumo de solução de sacarina a 0,2% e de água filtrada em menor escala. Dantzer (1977b) ainda relata um efeito similar sobre o consumo de soluções pouco palatáveis, como leite com quinino, solução de NaCl a 1,5% e solução de ácido tartárico a 0,5%, após a administração de benzodiazepínicos.

O efeito de benzodiazepínicos sobre o comportamento parece ser dependente do esquema de reforço. Burke, Miller e Moerschbaecher (1994) encontraram efeitos dependentes da dose de tratamento de lorazepam e alprazolam em diferentes esquemas e diferentes respostas. Os autores treinaram dois operantes (pressão à barra e focinhar) e três esquemas: razão fixa (FR) 20, intervalo fixo (FI) 2 min e reforço diferencia de baixas taxas e reforço (DRL) 20 s. Primeiro, observaram redução no responder em FR 20 com ambos os tratamentos. O lorazepam reduziu a taxas de respostas na barra em doses de 0,32-5,6mg/kg e a taxa de focinhar em doses de 18-56 mg/kg. O alprazolam reduziu o responder à barra em doses de 0,56-1,8 mg/kg e o focinhar em doses de 32-56 mg/kg. Já no esquema de FI 2 min, foi observada uma redução na taxa de pressão à barra com o tratamento com lorazepam (1-1,8 mg/kg), assim como uma redução do focinhar (3,2-5,6 mg/kg). O tratamento com alprazolam, entretanto, trouxe um aumento no responder à barra na dose de 0,1 mg/kg e uma redução na dose de 1,8 mg/kg; o focinhar foi diminuído na dose 1,8 mg/kg. Por último, o tratamento com alprazolam trouxe aumento no responder em DRL 2 sec. com doses de 0,32-5,6 mg/kg, com exceção de 3,2 mg/kg, e redução na dose de 18 mg/kg. Já o lorazepam causou aumento no responder nas doses de 0,32-3,2 mg/kg e redução no responder na dose de 10 mg/kg. Em resumo, lorazepam foi capaz de reduzir o responder em esquemas de FI e FR, mas causou aumento em DRL e alprazolam teve efeito de redução em FI e FR (em alta dose) e de aumento em FR (em baixa dose) e DRL, indicando que mesmo drogas com funcionamento similar, em esquemas iguais, podem trazer diferentes efeitos sobre o responder.

Nikiforuk e Popik (2009), observaram que o clordiazepóxido fornecia certa “proteção” relativa contra os efeitos da redução da magnitude de um reforçador sobre a resposta. Para tal, os autores formaram dois grupos de animais: Experimental e Controle. O grupo Experimental foi treinado a apertar uma barra por uma solução de sacarose de concentração de 32% sob um esquema de razão progressiva (PR). O grupo Controle foi treinado no mesmo esquema, mas com uma solução de sacarose de concentração de 4% como reforçador. Primeiramente, foi demonstrado que o responder por solução a 32% apresentou as maiores taxas, enquanto o responder pela solução a 4% apresentou as

menores. Foi então iniciado tratamento dos animais do grupo Experimental; parte do grupo recebeu clordiazepóxido (2, 4 e 8 mg/kg) e parte solução salina isotônica¹. Foi então reduzida a concentração da solução usada como consequência, de 32% a 4%. Todos animais do grupo Experimental apresentaram redução no responder. Os animais tratados com clordiazepóxido a 4 e 8 mg/kg, entretanto, apresentaram uma redução significativamente menor do que os tratados com salina ou clordiazepóxido a 2 mg/kg. Não foram observadas alterações no responder quando os animais do grupo Controle receberam tratamento com clordiazepóxido a 8 mg/kg (dose com maior eficácia), entretanto.

Buckland, Mellanby e Gray (1986), investigaram o efeito do clordiazepóxido em uma situação de discriminação sucessiva. Para tal, ratos foram treinados com dois estímulos luminosos, um sinalizando a disponibilidade de obtenção de solução de sacarose a 10%, em VI 18s, outro sinalizando não recompensa, apresentados sucessivamente. Foi observado um aumento no responder em ambos os componentes (reforçador e não), sendo maior no componente não reforçado. Os autores apontam que o efeito da droga pareceu ter maior efeito quando a linha de base apresentava uma média alta de respostas e na condição que apresentou pior discriminação (quando o reforço estava associado à uma luz contínua e o não reforço à uma luz intermitente). Ambos esses fatores parecem indicar uma interação com a droga sobre o controle exercido pelos estímulos ambientais sobre o responder dos animais.

Os benzodiazepínicos também afetam os efeitos da extinção sobre o comportamento. Dantzer (1977a) observou aumento da resistência à extinção em animais tratados com diazepam. Porcos foram treinados a responder em esquema de reforçamento contínuo (CRF) por alimento. Uma vez que o comportamento foi estabelecido, os animais foram tratados com diazepam 1 mg/kg e submetidos a uma sessão de extinção. A duração da sessão dependia do responder dos animais, sendo terminada após 5 min sem respostas registradas. Dantzer notou que tanto a duração da sessão (ou seja, a persistência no responder), como a quantidade de respostas, foi significativamente maior no grupo tratado com diazepam. Em discussão do experimento, o autor descarta explicações como de um feito desinibitório ou antiaversivo, e postula que é possível que a droga tenha um efeito de aumentar ainda mais a probabilidade da resposta mais provável (i.e.: a resposta de focinhar, a mais provável de ocorrer na situação experimental em função do treino prévio,

¹ Outras drogas cocaína HCl, fluoxetina citalopram, desipramina e morfina - foram testadas, porém não apresentam relevância para o presente estudo.

teria sua probabilidade de ocorrer aumentada para além da linha de base). O autor ainda coloca que esse mecanismo explicaria o responder para além da linha de base na situação de extinção, observado em seu experimento. Esse argumento é contraponto à proposta de Gray (1977) de que benzodiazepínicos aumentariam a resistência à extinção por reduzirem a quantidade de respondentes causados pela situação aversiva.

Segundo Gray (1977), a situação aversiva decorrente da remoção do reforçador levaria ao aumento da probabilidade de ocorrência de respostas emocionais e respondentes, que suplantariam a resposta alvo. Dessa maneira, a resposta alvo não mais estaria presente, incorrendo na extinção. O tratamento com benzodiazepínicos impediria esse processo, levando à uma persistência no responder. Essa explicação, entretanto, não dá conta de explicar como o tratamento com benzodiazepínicos poderia levar o responder em extinção para acima do observado na linha de base, conforme observado por Dantzer (1977a).

Também Buckland, Mellanby e Gray (1986) observaram aumento da resistência à extinção em tarefas de labirinto com o tratamento com clordiazepóxido. Nessa tarefa, o animal devia percorrer um corredor para alcançar um local no qual havia comida. Os animais do grupo de tratamento com clordiazepóxido receberam a droga a 5 mg/kg a partir dos últimos dois dias de treinamento e durante as sessões de extinção. Em seguida, a resposta de percorrer o labirinto foi colocada em extinção. Esses animais apresentaram uma resistência à extinção significativamente maior do que o grupo controle.

Uma série de artigos (Leslie, Shaw, McCabe, Reynolds e Dawson, 2004; Leslie, Shaw, Gregg, McCormick, Reynolds e Dawson, 2005; Leslie e Norwood, 2013; McCabe, Shaw, Atack, Street e Wafford, Dawson, Reynolds, Leslie 2013) encontrou aceleração da extinção após a administração de clordiazepóxido e outros agonistas de GABA, efeito que seria contrário aos estudos de Dantzer (1977a) e Buckland et al (1986). Em Leslie et al (2005), um grupo de camundongos foi treinado a responder à barra em FR5, outro grupo treinado em FI 11s e outro grupo em FI 31s. Uma vez estabelecida a resposta, os animais passaram por 15 sessões de extinção. Metade dos animais iniciou o tratamento ao início da primeira sessão de extinção, a outra metade recebeu tratamento a partir da quinta sessão de extinção. Quanto ao tratamento, metade dos animais recebeu solução veículo, metade foi tratada com 15 mg/kg de clordiazepóxido intraperitoneal antes da sessão. Foi observado que, independente do momento de início de tratamento e do esquema vigente, a droga causou uma aceleração do processo de extinção. Essa facilitação, entretanto, só pode ser observada a partir da sétima sessão de extinção. Os animais do grupo veículo,

em contrapartida permaneceram respondendo ao longo das 15 sessões de extinção. Os autores postulam, a partir desses resultados, similares aos relatados em Leslie e colegas (2004), Leslie e Norwood (2013) e McCabe e colegas (2013), que a extinção se trataria dum processo com duas etapas distintas. A segunda etapa, iniciada a partir de cerca da sétima sessão de extinção, seria modulada por GABA e, por isso, afetada por agonistas deste neurotransmissor. Esse achado, entretanto, não dá conta de explicar todas as interações observadas de drogas moduladoras de GABA com o processo de extinção. Bouton, Westbrook, Corcoran e Marren (2006), por exemplo, observaram que a extinção da resposta de *freezing*, causada pela apresentação de um tom previamente pareado a um estímulo aversivo, foi desacelerada com a administração de muscinol, um ativador de GABA. Esses achados salientam a importância de se estudar de maneira mais aprofundada a relação de benzodiazepínicos e a extinção de diferentes tipos de respostas, por diferentes tipos de estímulo e em variados esquemas.

Com exceção de Nikiforuk e Popik (2009), os estudos relatados se fizeram uso de esquemas simples de reforçamento, como FR e VI. Outros esquemas, entretanto, podem ser utilizados para o estudo do efeito de drogas sobre o comportamento operante. De especial interesse para nossos objetivos são o esquema de PR e o esquema de segunda ordem. Esses esquemas têm longo uso histórico na área da farmacologia comportamental por permitir análise mais aprimorados do responder sobre o efeito de drogas.

Em um esquema de PR, o número de respostas ou razão para a obtenção de um reforçador cresce a cada razão cumprida. Usando esse esquema, Hodos (1961) treinou ratos a responderem à barra por leite condensado diluído. A cada reforçador obtido, a razão exigida aumentava em duas respostas. As sessões eram terminadas depois de se passarem 15 min consecutivos sem respostas. Os dados mostraram que manipulações como aumentos na privação, concentração e quantidade de reforçador tiveram como efeito o aumento da razão máxima atingida - denominada *Breaking Point* (BP). O BP é utilizado como uma medida da eficácia ou potência do reforçador, ou seja, de sua capacidade de sustentar o responder (Roane, 2008). Foi demonstrado que variações na privação do sujeito ou em dimensões do reforçador, assim como na palatabilidade do mesmo, produzem alterações no BP de maneira confiável e proporcional (Hodos, 1961; Hodos & Kalman, 1963; Reilly, 1999).

O esquema PR é muito utilizado para estudar o controle de reforçadores diferentes sobre o comportamento (Garcia-Mijares e Silva, 2012). Por exemplo, Roane, Lerman e Vorndran (2001) demonstraram que o PR foi efetivo em identificar corretamente o estímulo

com maior controle sobre o comportamento de dois estímulos dados como igualmente reforçadores em uma situação de escolha livre. Quatro crianças foram colocadas em uma situação de escolha na qual deveriam selecionar o objeto preferido em uma dupla de objetos apresentados, dentro de um conjunto de diferentes objetos. Após a seleção, a criança recebia o objeto por 20 segundos. Dois objetos com frequência de escolha semelhantes foram selecionados. Foi instalado um esquema de PR para a obtenção dos objetos reforçadores. Os BPs foram então analisados de forma a identificar qual objeto tinha maior controle sobre o comportamento. Posteriormente, esses mesmos objetos foram utilizados como reforçadores de comportamentos alternativos à comportamentos problemas. Em todos os casos, o estímulo identificado como relacionado ao BP mais alto foi mais eficiente em instaurar o comportamento alternativo. Os autores discutem que é possível que o maior custo de resposta, associado ao esquema PR, faça com que pequenas diferenças entre a eficácia dos estímulos se tornem mais salientes.

O esquema de Segunda Ordem ou de ordem superior é outro procedimento frequentemente utilizado na farmacologia comportamental e neurociências (Sutton & Beninger, 1999). Esquemas de ordem superior são definidos por Catania (1999) como esquemas que possuem como unidade comportamental outro esquema. Ou seja, para a compleção do esquema de segunda ordem, um esquema de primeira ordem precisa ser cumprido. Esses diferentes esquemas podem ter consequências diferentes. Por exemplo, em um esquema FI 50min (FR 10: Luz) a décima resposta na barra terá como consequência uma luz; já a décima resposta à barra após 50 segundos, terá como consequência algum outro estímulo, como, por exemplo, alimento. Os esquemas de segunda ordem têm sido utilizados para estudar o responder por reforçadores condicionados, por poderem ser apresentados de maneira independente do reforçador incondicionado, e sem submeter a resposta a processos longos de extinção (Kelleher, 1966). A avaliação do desempenho sob esse esquema é tipicamente realizada pela análise do total de respostas dadas para cada componente, assim como da quantidade de componentes completados por sessão. Adicionalmente, o esquema pode ser formado de maneira tal que exija taxas altas ou baixas de responder para cada componente, de acordo com o interesse do estudo.

O responder em um esquema de segunda ordem também é sensível a manipulações como privação e magnitude de reforçador, de maneira similar ao encontrado com esquemas de Razão Progressiva. Spear e Katz (1991) submeteram macacos-de-cheiro a esquemas de segunda ordem simples [FI10min (FR10:luz)] e com razão progressiva [FI10min (PR:luz), sendo a PR usava 10, 30, 100, 300, 1000 e 3000]. O esquema de intervalo tinha

como consequência alimento (0 a 5,7 mg por componente) ou cocaína (0 a 300 ug/kg por injeção). Foi observado que, no esquema de segunda ordem simples, o responder aumentou progressivamente com o aumento da magnitude da recompensa, reduzindo somente quando a magnitude das consequências era extremamente alta, para ambos as consequências (comida e cocaína). Já para o esquema de segunda ordem com razão progressiva, foi observada uma diferença no responder por cocaína e alimento: em magnitudes altas, foi observada uma queda no responder por alimento, mas não por cocaína.

Também podem foram observados efeitos de tratamento farmacológico prévio sobre o responder em esquemas segunda ordem. Wing e Shoaib (2010) buscaram estudar os efeitos da nicotina sobre o responder por reforçadores condicionados e incondicionados. Para tal, treinaram ratos a responder em um esquema de segunda ordem com dois reforçadores, um condicionado (LUZ), apresentado em um esquema superior de intervalo, e um incondicionado (solução de sacarose), apresentado em um esquema de razão. Os animais passavam por cinco sessões semanais, quatro sessões denominadas de “manutenção”, que tinham como objetivo fortalecer a relação do estímulo condicionado com o reforçador incondicionado, e uma sessão de teste. A cada dia das sessões de manutenção, era aumentado o intervalo utilizado para a apresentação do reforçador incondicionado, com a seguinte progressão: FI 2 min (FR5: LUZ), FI 5 min (FR5: LUZ), FI 10 min (FR5: LUZ) e FI 15 min (FR5: LUZ). Três sessões de teste foram programadas, utilizando os seguintes esquemas: FI 15 min (FR5: LUZ), FR5 com somente a luz como consequência e FI 15 min com somente a solução de sacarose como consequência. Os animais receberam tratamento com salina ou nicotina (0,05, 0,1 e 0,2 mg/kg) cronicamente após as sessões de treino. Durante as sessões de teste, o tratamento ocorreu 10 minutos antes da sessão. Foi observado que a administração de nicotina anterior à sessão aumentou o responder em todas as condições de teste para os animais que tinham sido previamente tratados com nicotina, mas não para os que haviam sido tratados com salina. A nicotina não afetou diferencialmente as condições de teste.

As diferenças entre os esquemas descritos (Razão Progressiva e Segunda Ordem) têm várias consequências para o estudo experimental do comportamento. Por exemplo, a razão progressiva não é sujeita a efeito de teto (Nikiforuk & Popik; Reilly, 1999), quando comparada com esquemas de razão simples, apresenta maior sensibilidade em detectar diferenças na força de diferentes reforçadores (Hodos, 1961; Reilly, 1999, Roane e colegas, 2001) e permite a comparação entre diferentes reforçadores (Hodos, 1961). O esquema de

segunda ordem, por outro lado, tem as vantagens de gerar pelo menos dois padrões de resposta em uma mesma sessão experimental, permitir avaliar o responder pelo reforçador condicionado e pelo primário em uma mesma sessão (Wing & Shoaib, 2010) e poder ser programável para gerar baixas taxas de respostas.

Ambos os esquemas também estão sensíveis para detectar os efeitos de drogas sobre o comportamento que são dependentes do esquema. Dews (1955) treinou pombos em dois esquemas, FR50 e FI 5'. Os animais então foram tratados cada um com cinco doses de pentobarbital (1, 2, 4 e 5,6 mg) e uma dose de solução salina. Quando os animais haviam passado por todos os tratamentos, foram submetidos ao outro esquema (ou seja, os animais treinados em FR50 passaram a FI 5' e vice-versa) e foram novamente tratados com as cinco doses de pentobarbital e salina. Os esquemas produziram perfis de resposta diferentes (altas para FR50 e baixas para FI 5'). Foi encontrado um efeito de depressão (redução) da resposta nos animais em FI 5' e de aumento nos animais em FR50 para doses de 1 e 2 mg. Efeitos similares também foram relatados com benzodiazepínicos, levando inclusive ao desenvolvimento de teorias de que o efeito principal de benzodiazepínicos sobre o comportamento seria o de normalização de taxa – redução de taxas altas e aumentos de taxas baixas (Dantzer, 1977b). Se torna especialmente importante, portanto, o uso de mais de um tipo de esquema na investigação dos efeitos de benzodiazepínicos.

Efeito de benzodiazepínicos sobre respostas mantidas por reforçadores condicionados

Os estudos até o momento descritos se ocuparam com o efeito de drogas sobre o responder estabelecido usando reforçadores primários ou incondicionados – isso é, estímulos que tem sua potencial função reforçadora determinada pela história filogenética da espécie, além da situação atual do organismo, como nível de privação, por exemplo (Catania, 1999; Hodos e Kalman, 1963). O responder, entretanto, pode ser mantido por outros tipos de consequências, como os denominados reforçadores condicionados ou secundários (Williams, 1994a). Segundo Williams (1994b), o interesse e importância conferidos aos reforçadores condicionados têm diminuído consideravelmente em relação à ênfase dada por autores clássicos como Skinner; apesar disso, argumenta a favor da relevância desse conceito, que será discutido a seguir.

A sua função reforçadora de um reforçador condicionado é adquirida por meio da história de condicionamento com um reforçador incondicionado (Kelleher e Gollub, 1962). Uma forma de se transferir função reforçadora para um estímulo previamente neutro é a

apresentação sistemática do estímulo neutro seguida de apresentação do reforçador incondicionado (Kelleher e Gollub, 1962). Algumas dimensões que afetam a efetividade desse procedimento são conhecidas, sendo necessárias algumas características além da contiguidade, como por exemplo, contingência entre os estímulos (Mazur, 2005).

O controle de um reforçador condicionado sobre o comportamento pode ser demonstrado em procedimentos de instauração de uma nova resposta, assim como na desaceleração do processo de extinção observada quando apenas o reforçador condicionado, mas não o incondicionado, é contingente à resposta (Skinner, 1938; Williams, 1994a).

A questão da analogia entre a função reforçadora entre estímulos condicionados e incondicionados tem sido amplamente discutida pela literatura. Shahan (2010) em revisão sobre o tema, aponta como estudos iniciais de Herrnstein (1964) indicaram uma função direta entre a taxa de reforçamento do reforçador incondicionado e a força do reforçador condicionado a ele associado. Fantino (1969), entretanto, demonstrou que alterações no procedimento de Herrnstein (1964) levavam a diferentes resultados, indicando que somente a taxa de reforçamento do reforçador incondicionado não era suficiente para inferir o valor do reforçador condicionado. Adicionalmente, Shahan (2010) demonstrou que a força da resposta, quando medida pela resistência à mudança, é afetada por mudanças em parâmetros do reforçador incondicionado segundo previsto pelo momento comportamental, mas não por mudanças equivalentes em parâmetros do reforçador condicionado. Essa literatura sugere que as propriedades reforçadoras do reforçador condicionado e o reforçador incondicionado podem não ser semelhantes. De fato, Shahan (2010) levanta hipóteses de outras funções possíveis dos estímulos associados à reforçadores, como de sinalizadores, similar ao conceito clássico de discriminação.

Apesar, ou talvez em função, do funcionamento e natureza dos estímulos condicionados não serem completamente compreendidos, o seu estudo é de extrema relevância. Em especial, por benzodiazepínicos se tratarem de um tipo de medicação voltada ao tratamento de distúrbios ansioso, que são fortemente relacionados à estímulos condicionados (Dunsmoor e Paz, 2015) o estudo de como sua função pode ser afetada por essas drogas se torna tão importante quanto o estudo desses efeitos sobre reforçadores incondicionados.

Apesar disso, pouco tem sido estudado em relação ao efeito de benzodiazepínicos sobre reforçadores condicionados, embora muitos tenham sido desenvolvidos investigando seus efeitos em punidores condicionados. Killcross, Everitt e Robins (1997) observaram

que o tratamento com midazolam (doses de 0,1 mg/kg a 1,0 mg/kg) não teve efeitos sobre a escolha entre um estímulo neutro e um estímulo previamente pareado com alimento. Ratos foram treinados a responder em duas barras por pelotas de alimento sob esquemas concorrentes de VI 60s (conc VI 60s VI 60s). Esse esquema vigorou até o responder se tornar estável, então entrou em vigor adicionalmente um concorrente VI 120s VI 120s, tendo dois sons (A – um tom contínuo e B – uma sequência de clicks, ambos com 10s de duração) como consequência, cada um associado a uma barra. Um dos sons também estava associado com o acionamento de uma bomba que disponibilizava uma solução de 20% de sacarose. A escolha do som a ser pareado com a apresentação de sacarose foi feita de maneira aleatória e balanceada, se mantendo constante ao longo do experimento. Uma vez que os animais atingiram alocação de 70% das respostas na barra relacionada à disponibilização de sacarose, foi iniciada a fase teste. No teste, a apresentação de sacarose foi removida, vigorando então um esquema concorrente com apresentação de pelotas de alimento em VI 60s e do tom condicionado em VI 120s em uma barra e os mesmos esquemas, porém com a apresentação do tom neutro, na outra. Metade dos animais também tiveram as barras invertidas durante o teste, tornando a barra previamente associada ao som neutro produtora do reforçador condicionado e vice-versa. O tratamento farmacológico foi administrado imediatamente antes da sessão de teste. Não foi encontrado efeito significativo do tratamento com midazolam sobre o responder, com exceção da dose de 1,0 mg/kg, com a qual foi observada supressão do responder, possivelmente causado pelo efeito sedativo da droga.

Fernando, Urcelay, Mar, Dickinson e Robbins (2013) obtiveram resultados semelhantes utilizando diazepam. Ratos receberam pelotas de sacarose acompanhadas de tom previamente neutro, em procedimento de pareamento. Esse estímulo sonoro foi utilizado como consequência no treino de uma nova resposta, a pressão à barra. Neste treino, estavam presentes duas barras, ativa (produzia o estímulo condicionado) e inativa (produzia um estímulo neutro). Se verificou que somente o estímulo condicionado foi significativamente preferido e capaz de estabelecer a nova resposta. Os animais então foram tratados 30 minutos antes da sessão com diazepam (0,1 mg/kg e 0,3 mg/kg) e novamente expostos à situação com duas barras, uma inativa e uma produtora do reforçador condicionado. O tratamento não teve efeito sobre o responder por nenhuma das barras, em nenhuma dose.

Apesar das pesquisas aqui citadas indicarem que os benzodiazepínicos não alteram o responder por reforçadores condicionados, parece prematuro generalizar esse resultado

para outras condições de controle por reforçadores condicionados, pois em ambos os estudos relatados foram apenas utilizados esquemas simples de reforçamento. É possível que com o uso de esquemas mais complexos, como o PR e segunda ordem, sejam observadas diferentes facetas do funcionamento das drogas sobre os reforçadores condicionados, potencialmente omitidas por limitações inerentes ao uso de esquemas simples de razão e intervalo.

Justificativa e Objetivo

Considerando: (a) a pouca literatura existente sobre o efeito de benzodiazepínicos sobre a função de reforçadores condicionados, (b) a divergência na literatura sobre o efeito de benzodiazepínicos sobre o responder e (c) a relevância prática de compreender esses efeitos em uma atualidade na qual benzodiazepínicos são drogas de amplo uso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do ansiolítico bromazepam sobre respostas mantidas por reforçadores condicionados e incondicionados nos esquemas de Razão Progressiva e Segunda Ordem.

EXPERIMENTO I Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados, conforme medido por um esquema de razão progressiva, em ratas fêmeas.

Este experimento teve como objetivo verificar a viabilidade dos procedimentos que seriam utilizados, assim como iniciar a investigação da questão principal da pesquisa, o efeito do bromazepam o sobre o valor reforçador de reforçadores condicionados. Para este estudo preliminar foi escolhido como índice de valor reforçador o número de reforçadores totais obtidos por sessão (BP) sob um esquema de Razão Progressiva, em virtude desse índice ser uma medida sensível ao efeito das drogas sobre a eficácia de estímulos reforçadores (Richardson & Roberts, 1996).

MÉTODO

Sujeitos

Participaram 9 ratos albinos, *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, de aproximadamente 9 meses de idade ao início do experimento, com peso médio de 300 g. Foram alojadas em grupos de dois (n=6) ou três (n=3) em micro isoladores (38X32X16 cm) de poliuretano semitransparente, com grade superior para a alimentação. Os micro isoladores estavam colocados em uma estante ventilada de marca ALESCO, com isolamento e filtragem de ar. Foram mantidos em um ciclo de 12h luz/escuro, com as luzes sendo apagadas às 20 h. Tiveram acesso água à vontade e acesso de comida restrito em 10 g ao dia (essa restrição manteve 80% a 85% do peso *ad libitum*).

Equipamento

Foram usadas câmaras de condicionamento operante de fabricação Med- Associates, de dimensões 32x25x21 cm, isoladas acusticamente. Em uma das paredes, cada caixa possuía duas barras (à direita e à esquerda da parede) de aproximadamente 5 cm de largura, colocadas a 8 cm do chão da caixa. Apenas a barra esquerda foi manipulada experimentalmente. Entre as barras, a 5 cm do chão, havia uma abertura quadrada que permitia o acesso à cuba de um bebedouro de 0,05 ml de capacidade. Um estímulo luminoso de 1 W (luz branca, por detrás de uma placa fosca branca) estava localizado 7 cm acima de cada barra e era utilizado como consequência à resposta à barra conforme descrito adiante. Adicionalmente, a caixa operante foi iluminada por uma *housetlight*

localizada na parede oposta à dos bebedouros, direcionada ao teto, de maneira a produzir iluminação difusa e indicar o início da sessão.

O funcionamento das caixas e o registro das respostas foi feito através de um computador IBM-PC, com programas e interface da Med Associates.

Preparação farmacológica

A droga bromazepam (IPharma Nostra) foi diluída em veículo (VEI) composto de 17% Propilenoglicol, 1% Tween 80, e 82% solução salina (cloreto de sódio a 0,9%), à 1 mg/kg do animal e administrado por via intraperitoneal (i.p) na concentração de 1 mg/ml (Takahashi et al, 2009). O veículo utilizado no grupo controle foi cloreto de sódio a 0,9%. Tanto o bromazepam, quanto o veículo eram preparados duas horas antes do início sessão experimental

A solução de água com sacarose a 10% de concentração, utilizada como consequência de pressão à barra, também foi preparada diariamente, via diluição de açúcar comum em água de torneira.

Medição do ciclo estral

Para extração do material vaginal, foram utilizadas: uma pipeta monocal de volume variável (10 microl a 100 microl), ponteiros sem barreira de capacidade compatível e solução salina (NaCl 0,9%). A matéria obtida foi observada em um microscópio CANON de ampliação 10, 20, 40x e 100x, aplicada em laminas de vidro de 26x76mm, cobertas com lamínulas de 18x18mm.

PROCEDIMENTO

O experimento foi dividido em 5 fases (Figura 1). Sessões ocorreram diariamente, até a conclusão do experimento

Fase I – Treino de pressão de barra (Modelagem)

A resposta de pressionar a barra esquerda (fundo) foi instalada utilizando um programa de auto modelagem. Esse programa acionava o bebedouro, disponibilizando 0,05 ml de solução de sacarose em água à 10% por 3s (SAC), simultaneamente com o acender do estímulo luminoso localizado acima da barra por 1,5s (LUZ), de duas formas: automaticamente, a cada 30s, e em consequência à pressão de barra. Essa consequência se manteve até a Fase IV. O critério de finalização da fase foi 3 sessões com 300 respostas cada ou 50 min. Após esse treino, a resposta de pressão a barra foi

mantida por mais 3 sessões de 50 min sob o esquema CRF e 5 sessões de 50 min sob o esquema de razão fixa 2 (FR2).

Fase II – Razão Progressiva (Linha de base - LB)

Nesta fase, a razão das pressões à barra aumentava progressivamente a cada reforçador, de acordo com a fórmula de Richardson e Roberts (1996):

$$\text{Exigência} = [5e^{(\text{número de critérios cumpridos} \cdot 0,2)}] - 5 \quad \text{(Equação 1)}$$

A Equação 1 prevê que em torno de 20 reforçadores sejam, ao máximo, obtidos por sessão, impedindo que a saciação ocorra facilmente. Adicionalmente, pelas diferenças entre exigências a cada reforçador apresentados serem muito grandes, essa progressão prevê uma maior estabilidade no BP obtido (Richardson & Roberts, 1996). No Anexo A encontrasse a lista de exigências resultantes da aplicação da fórmula.

Este esquema foi mantido nas Fases III e IV. As sessões sempre tiveram duração de 50 min.

Após 25 sessões a pressão a barra não tinha estabilizado. Mesmo assim foi iniciada a Fase III, pois a demora no início da administração das drogas poderia comprometer seu efeito pelo início de irregularidades hormonais (Mitchard e Klein, 2015) ou da senescência na fertilidade (Sengupta, 2013).

Fase III – Início da administração de drogas (Tratamento)

As ratas foram distribuídas em dois grupos: BRO (receberam Bromazepam; n=4) e VEI (receberam solução salina, n=5)². Essa distribuição se deu de acordo com a média de respostas obtidas na linha de base, de maneira que ambos os grupos fossem compostos de animais com perfil de responder em alta e baixa taxa, com uma média grupal de número de respostas semelhante. A escolha de qual grupo seria o controle e qual seria o experimental foi feita de maneira aleatória. O tratamento foi administrado sempre uma hora antes da sessão experimental e foi mantido por todo o restante do experimento (Fases III, IV e V). Esta fase durou 28 sessões experimentais.

² Esse experimento também contou com mais dois grupos experimentais, um tratado com citalopram e outro com um composto de citalopram e bromazepam. Como as investigações sobre citalopram foram abandonadas para o restante do trabalho, esses resultados foram omitidos, por terem se tornado irrelevantes para os objetivos da pesquisa. Entretanto, podem ser encontrados, assim como a discussão preliminar, no Anexo B.

IV - Remoção do Reforçador Incondicionado

Ainda sob o esquema de razão progressiva, as respostas tiveram como consequência a apresentação de apenas a luz. Esta fase durou em média 8 sessões³.

V - Remoção do Reforçador Condicionado (Extinção)

Nesta fase, não houve consequência programada para a resposta, se tornando assim, um esquema de extinção propriamente dita. O critério utilizado para o final do experimento foi de redução do responder à 10% da linha de base (fase anterior) ou, quando não atingido, 7 sessões.

Fase	Fase I Modelagem	Fase II Linha de base	Fase III Administração da droga	Fase IV Remoção do Reforçador Incondicionado	Fase V Remoção do Reforçador Condicionado
Consequência	Luz (1,5s) + Sac (0,05ml)	Luz + Sac	Luz + Sac	Luz	–
Esquema	CRF > FR2	Razão Progressiva	Razão Progressiva	Razão Progressiva	Extinção
Tratamento	–	–	Bromazepam Salina	Bromazepam Salina	Bromazepam Salina
	Dia 1	Dia 25	Dia 53	Dia 61	Dia 68

Figura 1. Delineamento e cronograma do Experimento I. São apresentadas as fases (I-V), sua duração, esquema de reforço vigente, junto com a consequência apresentada ao comportamento alvo, assim como tratamento administrado em cada momento.

Controle do ciclo estral

O ciclo estral foi medido via o procedimento detalhado em Marcondes, Biachi e Tanno (2002). Na cavidade vaginal das ratas era introduzida 0,01 ml de solução salina com uma pipeta de ponteira de 10 ul. A ponta da pipeta era então raspada gentilmente na lateral da cavidade, para certificar que as células alvo haviam se desprendido. Após essa manobra, o líquido era recolhido e passado para lamínas de microscopia de vidro simples.

Essas lâminas foram inspecionadas com auxílio de um microscópio, em ampliações de 10x e 40x, e o material obtido classificado em uma de quatro fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) de acordo com as células encontradas.

³ O critério inicial de redução estável do responder a 10% da linha de base não foi atingido por 16 dos sujeitos experimentais, o que levou à mudança de critério para quantidade de sessões.

Análise de dados

Devido à função não linear de aumento de critério utilizado nesse experimento, foi utilizado o número de reforçadores obtidos durante a sessão experimental (que será referido doravante como “BP”) como objeto de análise e não o valor do último critério atingido. Foi feita análise do efeito das drogas sobre a média de reforçadores obtidos por sessão para cada sujeito e grupo, assim como da resistência à extinção após a remoção dos reforçadores (somente condicionado e, posteriormente, ambos).

Para análise do efeito das drogas sobre o valor do reforçador incondicionado, foi analisada a média dos BPs dos cinco primeiros dias da Fase III como representantes dos efeitos agudos e dos 5 últimos dias da Fase III como representantes dos efeitos crônicos.

Esses valores foram convertidos em porcentagem para cada rata, utilizando a média desses dias em relação à média da LB (últimos 5 dias da Fase II). A alteração da porcentagem média obtida para cada grupo de tratamento foi avaliada.

O efeito das drogas sobre o valor reforçador condicionado foi analisado de maneira grupal e individual. Para ambas as análises, as frequências de resposta obtidas por sessão foram convertidas em porcentagem em relação à LB (média dos últimos cinco dias da Fase III). Foram então obtidas as curvas para esses valores individuais e para a média de cada grupo. Essas curvas foram analisadas por inspeção visual.

Para análise do efeito do tratamento sobre a extinção (remoção de ambos os reforçadores), as respostas médias foram convertidas em porcentagem da linha de base (valor do último dia de tratamento), podendo dessa maneira ser inspecionada as curvas de proporção de mudança do comportamento.

Para a análise do efeito das fases do estro, foi medida a amplitude da variação de respostas (valor de responder mais alto e mais baixo encontrado) e comparado o estágio do estro encontrado no dia de sessão com a variação no mesmo dia, em busca de algum tipo de correlação.

RESULTADOS

Fase III - Efeito da administração aguda e crônica de bromazepam sobre o responder no esquema de RP (incondicionado + condicionado)

Foi analisada a média (\pm EPM), por grupo, de mudança percentual dos BPs, em relação à linha de base obtida na Fase III (Figura 2). Com administração aguda, houve redução dos BPs obtidos para o grupo de BRO (86%), enquanto a média de VEI não mudou expressivamente (102%).

Na fase de administração crônica, ambos grupos apresentaram leve redução nas médias em relação à administração aguda. O grupo BRO passou para 80%, enquanto o grupo VEI reduziu para 94%.

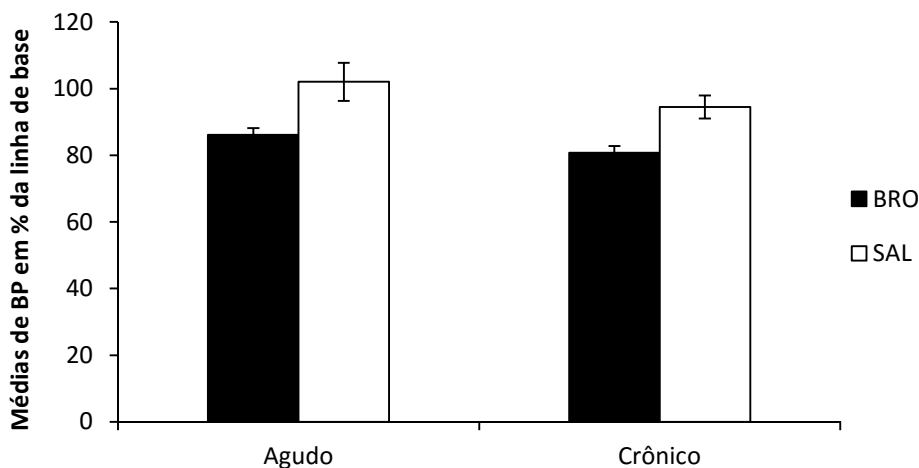


Figura 2. Efeito da administração aguda e crônica de BRO sobre o responder na Fase 3. Os dados representam as médias de reforçadores obtidos (BPs) (\pm DP), expressas em percentual em relação à linha de base, obtidas nos primeiros cinco dias (agudo) e os últimos cinco dias (crônico) de tratamento de bromazepam (BRO) ou veículo (VEI) na Fase III.

Fases IV & V – Efeito do tratamento com bromazepam sobre o responder mantido pelo reforçador condicionado e pela sua retirada

Na Figura 3 são apresentadas as médias de respostas para cada grupo em cada dia das fases IV e V. Observa-se que a remoção da luz (Fase IV) produziu decremento

progressivo da média de ambos os grupos, com médias finais do grupo VEI maiores do que as do grupo BRO.

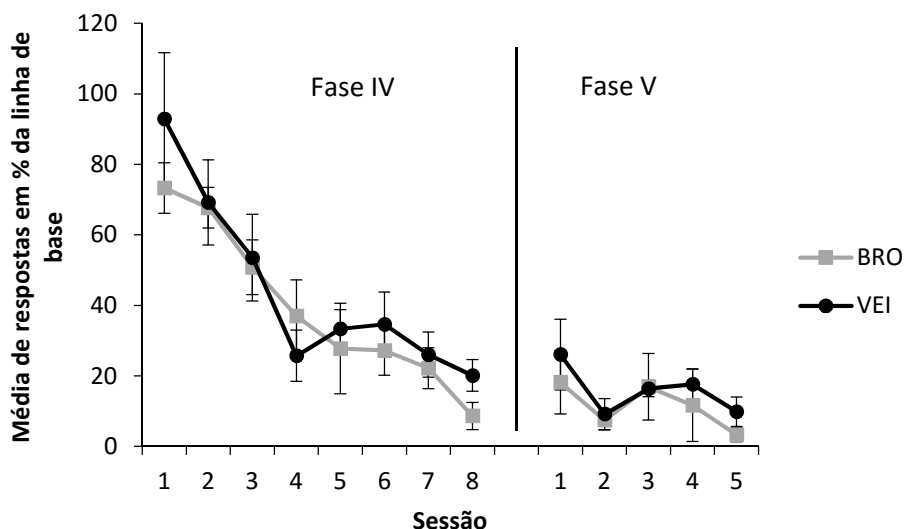


Figura 3: Efeito da remoção dos reforçadores, incondicionado (Fase IV), e condicionado e incondicionado (Fase V). Os dados representam o percentual de mudança do comportamento, obtido por conversão das médias de respostas obtidas para cada grupo (BRO e VEI), em porcentagem da linha de base (média dos últimos 5 dias da Fase III).

Investigação das linhas de tendência das curvas da fase IV (Figura 4) demonstrou que as curvas para ambos os grupos se aproximaram do linear ($R^2_{(BRO)}=0,95$ e $R^2_{(VEI)}=0,78$), e que os processos foram similares em ambos os grupos, com inclinação similar para ambos os grupos ($a_{(BRO)}=-9,05$ e $a_{(VEI)}=-9,22$).

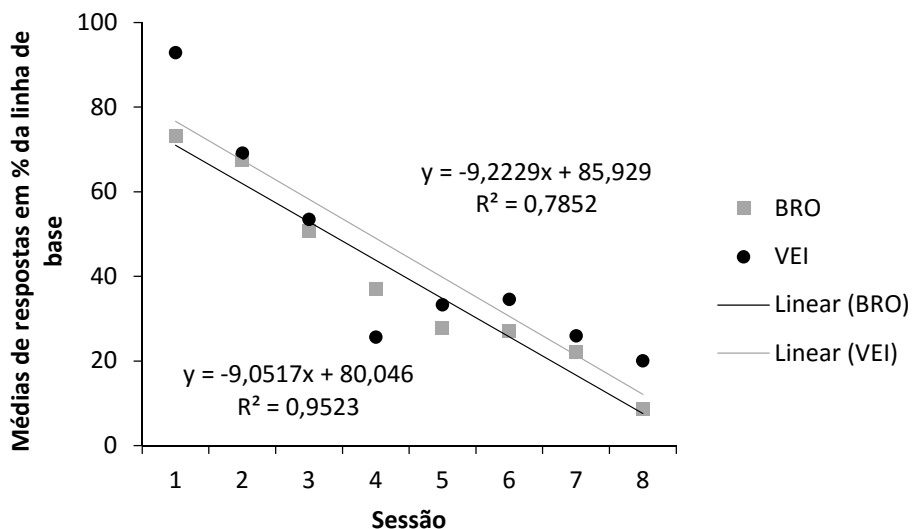


Figura 4: Linhas de tendência linear do responder médio de cada grupo, para a Fase IV. São apresentadas também as equações para cada linha (y), assim como o coeficiente de determinação (R^2).

As curvas individuais frequência de resposta em porcentagem da linha de base, obtidas nas Fases IV e V, podem ser vistas no Anexo B.

Controle Estral

Devido a problemas técnicos (conservação de amostras, técnica de análise, disponibilidade de equipamento), não foi possível fazer o controle do ciclo estral diariamente, de maneira a cobrir todas as fases do estro (Marcondes, Biachi e Tanno, 2002). Porém, as amostras obtidas indicaram que não houve correlação entre fase do estro e padrão de responder. A Tabela 1 apresenta a média de BPs registrado em cada fase do ciclo estral observada, assim como o número total de observações registradas.

Tabela 1 Média de respostas por fase estral

Fase do ciclo	Média (BP)	Observações registradas
Estro	14,14	7
Diestro	12,13	17
Proestro	13,6	19
Metaestro	12,14	21

A ciclagem registrada não seguiu o padrão encontrado na literatura (ciclo estral de em torno de 4 dias). Para alguns animais, somente uma fase do estro foi observada, mesmo em análises feitas em dias consecutivos. Alteração hormonal em função da idade ou tratamento (Mitchard e Klein, 2015), ou uma insuficiência do procedimento utilizado, podem ser considerados como causa.

DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que ocorreu um efeito da droga bromazepam sobre o responder em um esquema de razão progressiva. O tratamento diminuiu a frequência de resposta mantida pelo esquema.

O efeito do Bromazepam sobre o responder mantido por esquemas de reforço foi contrário ao observado em diversos estudos que apontam uma função de aumento do valor reforçador primário com benzodiazepínicos (Dantzer, 1976; Dantzer, 1977b; Buckland et al, 1986). Burke et al (1994), entretanto, apontam um resultado similar, em esquemas de FI e FR, com lorazepam (todas as doses) e alprazolam (altas doses).

Adicionalmente, não foi observado efeito da droga sobre o responder somente pelo reforçador condicionado, conforme observado em Killcross et al (1997) e Fernando et al (2013), indicando que quaisquer efeitos observados na eficácia do reforçador incondicionado não foram transferidos para a eficácia do reforçados condicionado.

Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre o porquê da diferença dos dados aqui relatados com os encontrados na literatura. Em primeiro lugar, os animais utilizados foram fêmeas, ao contrário da maioria dos estudos conduzidos na área (Beery e Zucker, 2011). É possível que alguma diferença metabólica ou de processamento da droga ocasionasse que seu efeito fosse diferente nos animais deste estudo (fêmeas) do nos animais de outros estudos, já que são conhecidas diferenças importantes quanto à reação para drogas entre os sexos (Waxman e Holloway, 2009).

De acordo, Ravenelle, Neugebauer, Niedzielak e Donaldson (2014) demonstraram uma diferença do efeito ansiolítico de diazepam em camundongos machos e fêmeas, com diferentes perfis ansiosos (alto ou baixo) no labirinto em cruz elevado. Especificamente, o tratamento com diazepam (1 mg/kg) só trouxe efeitos ansiolíticos significantes sobre os animais machos com perfil ansioso alto. Não foi encontrado efeito ansiolítico para as fêmeas. Os autores postulam que hormônios gonadais (assim como perfil de comportamento ansioso) podem modular o efeito ansiolítico de benzodiazepínicos. Isso se torna especialmente relevante, pois, de acordo com Gray (1977) o aumento do responder observado com tratamento de benzodiazepínicos advém de uma redução da aversividade advinda do não reforçamento, levando a um aumento no responder. Portanto, é possível que o aumento da resposta observado por Dantzer (1976) se deva à uma aversividade inerente ao esquema de razão progressiva, decorrente do aumento de razão, que foi reduzida com o tratamento com diazepam. A ausência desse efeito em animais fêmeas,

portanto, poderia ser ocasionado pelas diferenças de eficácia desse tipo de droga em machos e fêmeas.

É importante notar que essa diferença não se deve à uma maior variabilidade no responder acarretada ao ciclo estral, já que não foi encontrada evidência de que fêmeas apresentam maior variabilidade comportamental (Prendergast, Onishi e Zucker, 2014). Consistente com esses dados, e a despeito das limitações indicadas nos resultados, não foi encontrada covariação entre o responder e as fases do ciclo observadas.

Também não foi observado efeito do tratamento sobre o responder em extinção. É possível que isso se deva também a uma diferente sensibilidade à benzodiazepínicos por parte de fêmeas (Ravenelle et al, 1994). Entretanto, podem ser encontrados estudos com dados demonstrando tanto facilitação (Leslie, Shaw, McCabe, Reynolds e Dawson, 2004; Leslie, Shaw, Gregg, McCormick, Reynolds e Dawson, 2005; Leslie e Norwood, 2013; McCabe, Shaw, Attack, Street e Wafford, Dawson, Reynolds, Leslie 2013) quanto aumento de resistência (Danzer, 1976; Buckland et al, 1986; Bouton et al, 2006), indicando que, possivelmente, existem fatores desconhecidos envolvidos na interação comportamento/tratamento na situação de extinção sob efeito de benzodiazepínicos. É possível, também, que o efeito descrito por Leslie e colegas (2005) de facilitação da extinção não tenha sido observado em função da duração dessa fase experimental, uma vez que é indicado que esse fenômeno ocorre a partir do sétimo dia de extinção comportamental.

Por último, o número reduzido de sujeitos por grupo trouxe dificuldades em garantir que qualquer efeito observado não tenha se devido ao acaso. É por esse motivo que, para atingir os objetivos propostos, este estudo foi repetido incluindo mudanças no método que aumentaram o controle de algumas variáveis (variação hormonal, idade e número de sujeitos por grupo). Para evitar qualquer efeito do ciclo estral - mesmo que não observado neste experimento - ou da interação ente idade e fertilidade, no novo experimento foi apenas utilizado machos. Também foi adicionada uma fase de habituação ao procedimento de injeção, para separar possíveis efeitos aversivos desse procedimento do efeito agudo da droga.

EXPERIMENTO II Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados, conforme medido por um esquema de razão progressiva.

O Experimento II foi planejado como uma replicação sistemática do Experimento I, com maior controle de variáveis que poderiam ter interferido com os resultados do experimento, como: variações no ciclo estral, possível interferência decorrente de um efeito não previsto (como desconforto físico) do procedimento de injeção e idade dos animais. Portanto, seu objetivo foi medir o efeito da droga Bromazepam sobre o valor reforçador de um estímulo condicionado e um incondicionado, a partir da medição dos BPs obtidos em esquema de razão progressiva, em ratos machos.

MÉTODOS

Sujeitos

Participaram 18 ratos albinos, *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, machos, de aproximadamente 90 dias de idade ao início do experimento e cerca de 300 g de peso. As condições restantes foram idênticas ao experimento I, a exceto da alimentação, pois para manter o peso entre 80% a 85% do peso ad libitum foram necessários 13 g diários de alimento (machos, quando adultos, são maiores do que fêmeas).

Equipamento

Mesmo que no Experimento I.

Preparação farmacológica

Assim como no Experimento I, foi utilizada a droga Bromazepam, preparada e administrada da mesma maneira. Os animais do grupo controle, entretanto, receberam 1 ml/kg de um veículo composto de 17% Propilenoglicol, 1% Tween 80, e 82% solução salina (0,9% NaCl), igual ao veículo utilizado na diluição da droga.

A solução de sacarose ao 10%, utilizada como reforçador, foi também preparada de forma semelhante ao descrito no Experimento I.

PROCEDIMENTO

O procedimento (Figura 5) foi similar ao realizado no Experimento I (Figura 1), porém com algumas alterações a partir da Fase III. Entre a Fase III e IV, foi feita uma habituação à injeção para todos os sujeitos para diminuir o efeito dessa manipulação sobre o efeito farmacológico da droga (Fase II' – Linha de base (Injeção)). Para tal, injeções intraperitoneais de 0,2 ml de veículo foram administradas uma hora antes da sessão experimental. Assim que a estabilidade da resposta foi atingida (três sessões consecutivas com amplitude de variação do BP igual ou menor do que 3), o procedimento continuou conforme no Experimento I, sendo dado início a fase de administração de drogas. Adicionalmente, o grupo Controle recebeu solução veículo e não mais solução salina durante as fases de administração do experimento.

Devido ao comportamento mais estável dos sujeitos, em relação ao observado do Experimento I, a duração do Experimento II foi menor, já que os critérios de estabilidade (variabilidade menor do que 10% por três sessões seguidas na linha de base) foram atingidos mais prontamente.

Fase	Fase I Modelagem	Fase II Linha de base	Fase II' Linha de base (Injeção)	Fase III Administração da droga	Fase IV Remoção do Reforçador Incondicionado	Fase V Remoção do Reforçador Condicionado
Consequência	Luz (1,5s) + Sac (0,05ml)	Luz + Sac	Luz + Sac	Luz + Sac	Luz	–
Esquema	CRF > FR2	Razão Progressiva	Razão Progressiva	Razão Progressiva	Razão Progressiva	Extinção
Tratamento	–	–	Salina	Bromazepam Salina	Bromazepam Salina	Bromazepam Salina
	Dia 1	Dia 8	Dia 20	Dia 27	Dia 33	Dia 36

Figura 5: delineamento e cronograma do Experimento II. Circundados em cinza, as fases mantidas do Experimento I. Em preto, a nova etapa inserida (Fase II'). Abaixo, a duração de cada fase.

A coleta de dados ocorreu diariamente.

Análise de dados

Os dados da Fase III foram examinados de maneira similar ao Experimento I, com a diferença que como as médias obtidas na linha de base foram idênticas para ambos os grupos, não houve necessidade de conversão para porcentagem da linha de base. Também houve adição de análise estatística. Para a análise do efeito da droga, foram comparados

os valores dos BPs obtidos para cada grupo em três momentos: linha de base (último dia sem droga), efeito agudo (primeiro dia com droga) e crônico (último dia da Fase III). Para esta comparação, foi utilizado um modelo de análise de variância (ANOVA) mista, tendo como fator entre-grupos o grupo (BRO e VEI) e como fator intra-grupo o tratamento (linha de base, crônico e agudo). Quando diferenças significativas foram encontradas, foi utilizado o teste Tuckey para as comparações pós-hoc.

Das Fases IV e V foram analisadas, por inspeção visual, as curvas geradas pelos valores das médias das frequências de respostas em cada sessão. Adicionalmente os dados foram ajustados a funções matemáticas para a análise da inclinação das curvas. Ainda, foi realizado um t-student das médias das inclinações das curvas de cada grupo.

RESULTADOS

Fase III - Efeito da administração aguda e crônica de bromazepam sobre o responder no esquema de RP (incondicionado + condicionado)

Na Figura 6 são mostradas as médias (\pm EPM) dos reforçadores obtidos pelos grupos VEI e BRO na Linha de base (LB), no primeiro dia de tratamento (agudo - AG) e no último dia de tratamento (crônico - CRÔ). A comparação dessas médias pelo ANOVA mista revelou diferenças entre os tratamentos LB, AG e CRÔ ($F_{2,23}=7,538$; $p=0,002$) e interação entre os tratamentos e os grupos ($F_{2,23}=8,13$; $p=0,001$). O teste pos-hoc Tuckey para a interação indicou que só houveram mudanças nas médias de reforçadores obtidos no grupo tratado com bromazepam. Como mostra a figura, foi encontrado aumento significativo nas médias para ambos tratamentos com bromazepam (média_(AG)= 13,89, $p<0,01$ e média_(CRÔ)=12,56, $p=0,04$), em relação à LB (média_(LB) = 10,78). Já para o grupo VEI todos os contrastes mostraram diferenças não significativas ($p> 0,05$). Ainda, o teste Tuckey indicou que não houve diferenças entre os tratamentos AG e CRÔ para nenhum dos grupos ($p>0,05$).

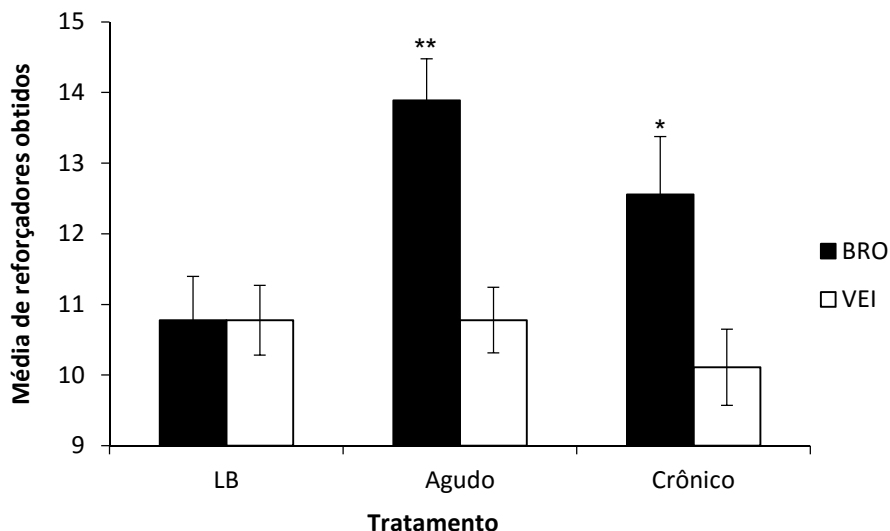


Figura 6: Efeito do Bromazepam sobre a quantidade de reforçadores obtidos no esquema de PR. Os dados representam as médias (\pm EPM) dos BPs obtidos na Linha de Base (Fase II') e no primeiro (Agudo) e último (sétimo) dia de tratamento (Crônico) na Fase III. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para diferenças com LB.

Em função do efeito da droga sobre o responder do grupo BRO, a média de reforçadores obtidos em CRO para os dois grupos foi desigual, sendo significativamente mais alta para BRO. Por essa razão, os dados das fases IV & V foram transformados em percentual em relação à linha de base, utilizando os valores de CRO como linha de base. Adicionalmente, como a fase V se tratava de uma fase de extinção e, portanto, não haviam BPs a serem medidos, se optou por analisar a frequência de respostas de ambas as fases, de maneira que essas pudessem ser comparadas em uma mesma medida.

Na Figura 7 são apresentadas as médias (\pm EPM) dos percentuais da frequência de resposta em relação à linha de base de cada sessão das Fases IV e V, para cada grupo (VEI e BRO). Buscando observar o efeito da retirada do reforçador primário na primeira sessão da fase IV sobre as respostas dos grupos, foi realizado um T-student comparando as médias dos percentuais dos grupos nesse dia. O teste mostrou que não houve diferenças significativas entre as médias ($T_{(16)} = -0,72$; $p = 0,48$), indicando que o bromazepam não alterou o efeito da retirada do reforçador primário na primeira sessão.

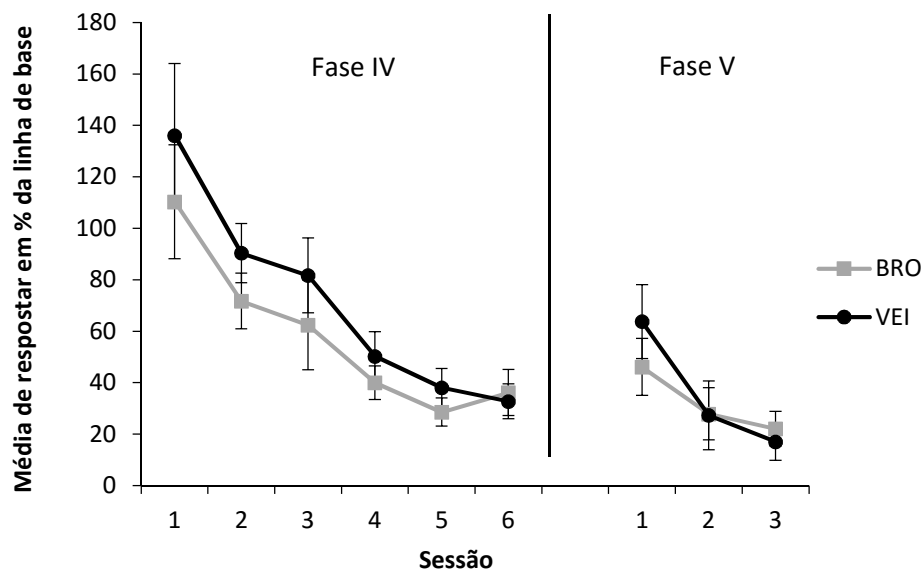


Figura 7: Efeito da remoção do reforçador incondicionado (Fase IV) e condicionado (Fase V) sobre as respostas médias (\pm EPM) de cada grupo, convertidas em porcentagem em relação à linha de base (CRO).

As curvas da Fase IV da Figura 7 mostram que os percentuais de mudança de ambos os grupos apresentam tendência a diminuir ao longo das sessões. Ainda se observa que a curva do grupo VEI na Fase IV parece mais acelerada que a curva do grupo BRO, o que poderia indicar um efeito do tratamento com bromazepam sobre a manutenção da resposta por reforçadores condicionados. Para averiguar essa possibilidade, foram construídas linhas de tendência para cada curva (Figura 8) e calculadas suas funções lineares e seus valores de R quadrado. Os valores R quadrado demonstraram que o padrão das respostas ao longo das sessões foi de fato linear ($R^2=0,92$ para a curva do grupo VEI e $R^2=0,86$ para a curva do grupo BRO) e as funções das curvas mostraram que a inclinação do grupo VEI ($a=-20,14$) foi maior do que a do grupo BRO ($a=-14,93$), indicando maior aceleração na curva do primeiro em relação ao segundo.

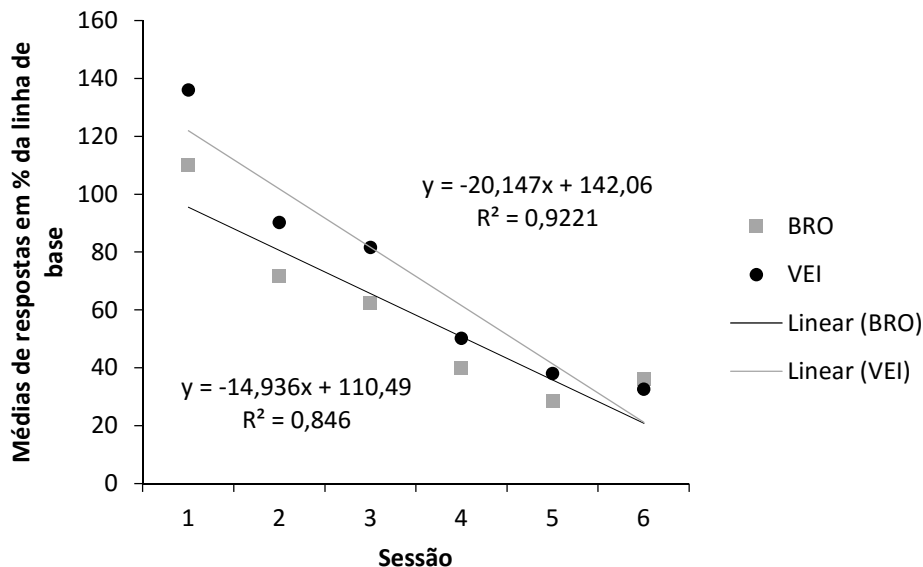


Figura 8: Curvas de tendência do responder para a Fase IV, incluindo fórmulas de regressão linear (y) e valores do coeficiente de diferenciação (R^2).

Foram construídas curvas para cada sujeito (Anexo B), calculadas suas funções e realizada análise estatística das inclinações das curvas para descartar a possibilidade de efeito de amostragem explicar as diferenças observadas entre as curvas dos grupos na fase IV. O teste t-student das médias das inclinações das curvas revelou que as inclinações das curvas dos sujeitos do grupo BRO não foram significativamente diferentes das inclinações das curvas do grupo VEI ($t_{(16)} = -0,723$; $p = 0,480$); houve, portanto, similaridade no processo de diminuição da resposta observado em ambos os grupos

Os resultados da Fase V foram similares aos da Fase VI. Como mostrado na Figura 8, houve similaridade nos processos de extinção dos grupos; de fato, o contraste entre as médias no primeiro dia da retirada do reforçador condicionado não foi significativo ($t_{(16)} = 0,677$; $p = 0,508$), como também não foi encontrada diferença entre as inclinações das curvas de extinção ($t_{(16)} = -0,628$; $p = 0,539$; dados não mostrados)

DISCUSSÃO

O Experimento II teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com bromazepam sobre o responder em um esquema de Razão Progressiva, com presença de (1) um reforçador condicionado e um incondicionado, (2) um reforçador condicionado e em (3) extinção. A análise dos dados demonstrou que a administração aguda de Bromazepam aumentou significativamente o responder pela solução de sacarose em conjunto com a apresentação de luz sob o esquema RP. Esses achados estão de acordo com os encontrados por Dantzer (1976), Dantzer (1977b) e Buckland et al (1986). Também vão de encontro com o descrito por O'Hare, Kim e Tierney (2006); em seu estudo, ratos foram treinados a responder por uma solução de sacarose, em uma razão cíclica (razão que aumentava de 8 em 8 incrementos a cada compleção, até atingir FR48 e, então, reduzia, novamente, de 8 em 8 incrementos, seguindo esse ciclo até 6 vezes por sessão). Uma vez que o comportamento estava estável, os animais foram tratados com clordiazepóxido (5 mg/kg), pentobarbital (5 mg/kg) (uma droga com efeito ansiolítico não benzodiazepínico, porém com funcionamento neuroquímico similar), e picrotoxina (1 mg/kg) (um bloqueador de canal GABA). Clordiazepóxido e pentobarbital tiveram o efeito de aumentar o consumo de alimento, enquanto picrotoxina teve o efeito contrário. Os autores defendem que esse aumento foi causado por um aumento percebido na palatabilidade do alimento, e que este seria o mecanismo de aumento de consumo ocasionado por benzodiazepínicos e drogas similares.

O aumento observado se manteve ao longo dos 7 dias de tratamento, indicando que não foi desenvolvida tolerância ou habituação significativa no período de duração do tratamento crônico (7 dias). Índícios do início de um processo de tolerância podem ser observados, entretanto, na queda relativa da média de respostas no último dia de tratamento, em relação ao primeiro, apesar do valor ainda se encontrar significativamente acima da linha de base.

Após a remoção do estímulo incondicionado como consequência, não foram encontradas diferenças significativas no comportamento observado para os dois grupos. Dada a semelhança observada no desempenho de todos os animais, tanto no grupo de tratamento, quanto controle, é plausível considerar que a droga não teve efeito sobre o responder por somente o estímulo condicionado, conforme observado em Killcross et al (1997) e Fernando et al (2013).

Novamente não foi observada diferença nos padrões de responder durante a fase de extinção/remoção do estímulo condicionado. Isso pode se dever em função da duração insuficiente da fase de extinção, já que é relatado que o efeito de facilitação da extinção do tratamento com benzodiazepínicos ocorre a partir do sétimo dia de extinção (Leslie et al, 2005).

EXPERIMENTO III - Efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de estímulos condicionados e incondicionados da resposta treinada sob um esquema de segunda ordem.

Esse experimento teve como objetivo medir o efeito do Bromazepam sobre o valor reforçador de um estímulo condicionado e um estímulo incondicionado apresentados sob um esquema de segunda ordem. O esquema de segunda ordem é tipicamente usado para medir valor reforçador de reforçadores condicionados independente. Diferente do esquema de razão progressiva, ele permite manipular de forma independente os esquemas sob o quais são apresentados o reforçador condicionado e o reforçador incondicionado.

É sabido que os efeitos de uma droga podem ser função do esquema de reforçamento em vigor (Dews, 1955; Dantzer, 1977b), portanto, o experimento foi delineado para aprofundar o estudo do efeito do Bromazepam sobre o responder, aos compara-los com o observado em Razão Progressiva. Essa decisão também foi fundamentada nos resultados do Experimento I e Experimento II, que indicaram efeitos aparentemente contraditórios.

Para tal, foi utilizado como modelo o procedimento de Wing e Shoaib (2010), descrito previamente. Esse procedimento se mostrou efetivo em identificar efeitos no responder de um tratamento farmacológico anterior à sessão, em relação à um grupo tratado com solução salina.

MÉTODO

Sujeitos

Participaram 20 ratos albinos, *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, machos, de aproximadamente 90 dias de idade ao início do experimento e cerca de 300 g de peso. As condições restantes foram idênticas ao Experimento II.

Equipamento

Foram usadas câmaras de condicionamento operante de fabricação Med Associates, de dimensões 32x25x21 cm, isoladas acusticamente. Em uma das paredes, cada caixa possuía uma barra retrátil (à esquerda da parede) de aproximadamente 5 cm de largura, colocada a 8 cm do chão da caixa. Ao lado da barra, a 5 cm do chão, se encontrava um bebedouro com dispensador de líquido do tipo *drop* (uma seringa acoplada à uma bomba, a qual, quando acionada, pingava a solução em um bebedouro redondo), regulado para administrar 0,05 ml por vez. Uma lâmpada de 1 W (luz branca) estava localizada 7 cm acima da barra.

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

Preparação farmacológica

Foi utilizada a droga bromazepam em concentração de 1 mg/ml e em dose de 1 mg/kg; a preparação e administração da droga e veículo foram idênticas ao Experimento II. Foi utilizada como consequência a mesma solução de sacarose descrita no método do Experimento II.

PROCEDIMENTO

O experimento constou de duas fases, Modelagem e Experimental.

I - Modelagem. Utilizando um programa automatizado, foi feita a modelagem da resposta de pressão à barra por um procedimento de auto modelagem. A cada 15 s, ou a cada pressão da barra, eram apresentados 1,5s de luz ininterrupta (LUZ) e disponibilizados 0,05 ml de solução de sacarose (SAC), sempre juntos. Uma vez que o critério de 200 pressões à barra por sessão foi atingido, foram realizadas mais 3 sessões de CRF, seguidas de 3 sessões de FR2 e, por fim, 3 sessões de FR5, sempre mantendo a mesma consequência de LUZ e SAC.

Uma vez que o responder em FR5 se mostrou estável (com variação no número de respostas menor ou igual à 10% entre sessões), iniciou-se a fase experimental.

II – Experimental. Nesta etapa, foram rodadas 5 sessões por semana (segunda a sexta), uma por dia. Essas sessões se dividiram em dois tipos: (A) Manutenção e (B) Teste. A cada semana eram realizados 4 tipos de sessões de manutenção (sessão M1 a M4) e uma de Teste (sessão T).

A - Manutenção. As sessões de manutenção tiveram como função treinar a relação do reforçador incondicionado com o estímulo condicionado. Isso foi feito pelo reforçamento sistemático da resposta de pressão a barra sob o esquema de ordem superior ou de segunda ordem. O esquema de primeira ordem foi um esquema de razão cinco (FR5); completar esse esquema tinha como consequência a apresentação do estímulo LUZ. O esquema de segunda ordem era um esquema de intervalo fixo (FI), que era diferente para cada sessão. O intervalo começava a ser contado após o término do primeiro FR5;

completar um componente de FR5 após transcorrido o intervalo tinha como consequência a apresentação de SAC e LUZ.

Nas sessões M1 o esquema de segunda ordem foi sempre FI 2 min (FR5: LUZ)⁴, em M2 foi FI 5 min (FR5: LUZ), em M3 foi FI 10 min (FR5: LUZ) e em foi FI 20 min (FR5: LUZ)⁵. Dessa maneira, a contingência entre a apresentação da luz e a emissão da resposta foi a mesma em todas as sessões, enquanto que o intervalo entre a resposta e a apresentação da solução de sacarose aumentou de sessão a sessão. Durante essa etapa, todos os animais receberam injeções intraperitoneais de VEI uma hora antes da sessão experimental.

B – Teste. Durante as sessões de teste, dez dos animais receberam bromazepam (Grupo BRO) e dez receberam veículo (grupo VEI), sempre 60 min antes da sessão experimental. Três condições foram testadas. Na sessão T1 a mesma contingência utilizada nas sessões M4 foi mantida. Ou seja, FI 20 min (FR5: LUZ). Na sessão T2, a resposta era mantida apenas por um esquema FR5, tendo a apresentação de 1,5 s de LUZ como única consequência. Já na sessão T3, a resposta era mantida apenas por um esquema FI 20 min, tendo apresentação apenas de SAC como consequência. A contagem do intervalo era iniciada por um componente de 5 pressões à barra.

As condições da Fase Experimental ficaram em vigência por três semanas, de forma que foram realizadas três sessões de cada tipo. As sessões M1 sempre aconteceram nas segundas, as M2 nas terças, as M3 nas quartas, as M4 nas quintas e as T nas sextas (Figura 9).

As sessões de todas as fases tiveram uma hora de duração.

⁴ A notação do esquema de segunda ordem consiste do esquema de primeira ordem entre parênteses, acompanhado do estímulo que produz, com o esquema de segunda ordem fora dos parênteses (por exemplo, um esquema de reforça a décima resposta ocorrida após 15 segundos com sacarose pode ser notada como FI 15sec (FR10: SAC) (Catania, 1999))

⁵ O experimento de Wing e Shoaib (2010) utilizou um intervalo de 15 minutos nas sessões M4 e T1, porém, em função de um erro de programação, esse intervalo foi de 20 minutos.

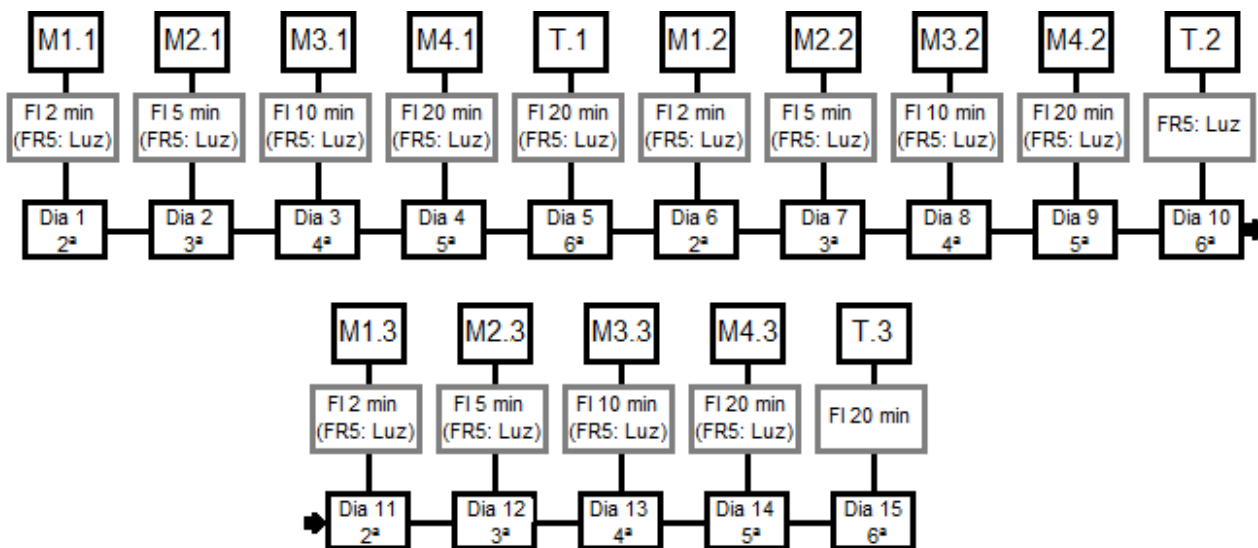


Figura 9 - Delineamento experimental do Experimento III. Os retângulos superiores indicam a sessão; os retângulos intermediários (cinzas) indicam a contingência em vigência; e os retângulos inferiores indicam o dia no qual a sessão ocorreu.

Análise de dados

Foi determinada como unidade de análise o total de respostas emitidas nas sessões M4 (último dia de manutenção) e T (teste). Foram feitos testes comparando a linha de base (M4) e teste (T), para cada um dos três testes feitos. Para tal, foi utilizado um modelo de análise de variância (ANOVA) mista, tendo como fator entre-grupos o grupo (BRO e VEI) e como fator intra-grupo o tratamento (manutenção e teste). Quando diferenças significativas foram encontradas, foi utilizado o teste Tuckey para as comparações pós-hoc.

Também foi investigado se as diferentes contingências programadas nas situações de teste (T1, T2 e T3) tiveram diferentes efeitos sobre o comportamento. Para tal, foi calculada, para cada grupo, a proporção de do responder em T em relação à linha de base (condições M4) respectiva. Esses valores foram comparados utilizando ANOVA, com grupo (BRO e VEI) como fator entre-grupos e condição (T1/M4.1, T2/M4.2 ou T3/M4.3) como intra-grupo.

O mesmo modelo foi utilizado para analisar o comportamento de responder ao longo das sessões de manutenção (M4.1, M4.2 e M4.3) e os efeitos do esquema vigente sobre o responder em cada sessão de teste (T1, T2 e T3).

RESULTADOS

Teste I – Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelos reforçadores condicionado e incondicionado

Na Figura 10 é apresentada a média (\pm EPM) do número respostas emitidas na linha de base (M4.1) e no Teste 1, para cada grupo. O teste ANOVA não encontrou efeito do bromazepam sobre o número de respostas; não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{(1,18)}=0,401$; $p=0,535$), nem interação entre as condições (M4.1 e T1) e grupos ($F_{(2,36)}=0,056$; $p=0,8150$). Entretanto, ambos os grupos responderam mais ($F_{(2,36)}=6,847$; $p=0,017$) na sessão M4.1 (média de 195,4 para o grupo BRO e 214,9 para o grupo VEI) do que na sessão T1 (média de 152,8 para o grupo BRO e 163,8 para o grupo VEI).

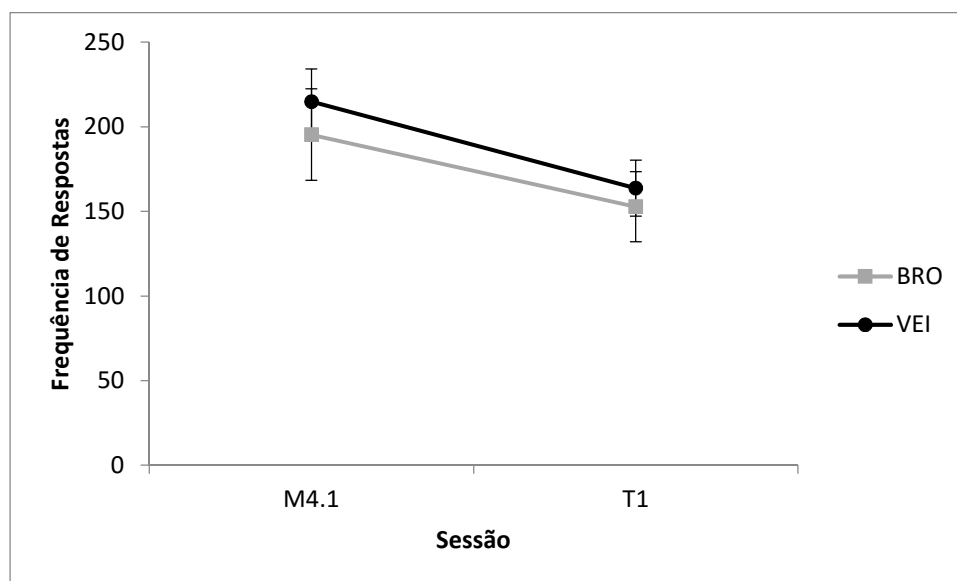


Figura 10: Efeito do tratamento sobre o responder em esquema de FI 20 min (FR5: LUZ). Os dados representam a média de respostas emitidas (\pm EPM) nas sessões de linha de base (M4.1) e experimental (T1) para cada grupo (BRO e VEI).

Foram registradas duas disponibilizações de sacarose para todos os sujeitos em ambas as sessões, indicando que a diferença observada entre M4.1 e T1 não foi função da frequência do reforçador primário.

Teste II – Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelo reforçador condicionado.

Na Figura 11 é apresentada a média (\pm EPM) do número de respostas emitidas na linha de base (M4.2) e no Teste 2 (FR5 com LUZ como consequência), para cada grupo. O teste ANOVA não encontrou efeito do tratamento sobre o número de respostas ($F_{(1,18)} = 0,376$; $p = 0,547$), nem interação entre as condições (M4.2 e T2) e grupos ($F_{(2,36)} = 0,038$; $p = 0,845$). Foi observada novamente uma queda no responder entre a sessão de linha de base e teste (de 235,6 resposta em média para 168,1, para BRO, e de 260,5 para 186,5, para VEI). Adicionalmente, a diminuição da frequência da linha de base (M4.2) para o Teste 2 foi significativa ($F_{(2,36)} = 18,407$; $p = 0,001$).

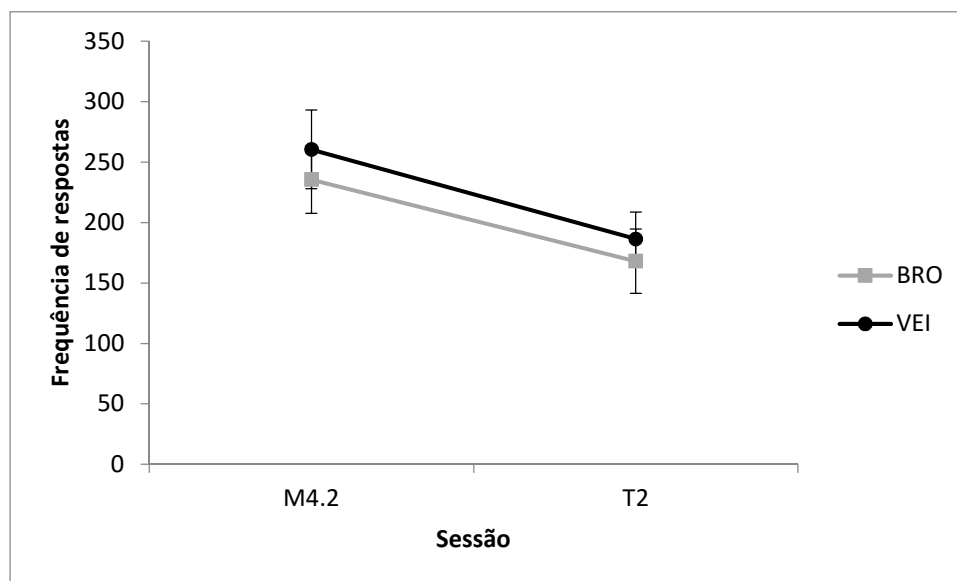


Figura 11: Efeito do tratamento sobre o responder em esquema de F5 (LUZ). Os dados representam a média de respostas emitidas (\pm EPM) nas sessões de linha de base (M4.2) e experimental (T2) para cada grupo (BRO e VEI).

Teste III - Efeito do bromazepam sobre a resposta mantida pelo reforçador incondicionado⁶.

Na Figura 12 é apresentada a média (\pm EPM), do número de respostas emitidas na linha de base (M4.3) e no Teste 3 (FI 20min com SAC como consequência), para cada

⁶ Em função de um problema na coleta de três ratos do grupo BRO (S1, S3 e S5) e de dois do grupo VEI (S2 e S4) na fase de teste 3, os dados desses sujeitos não foram incluídos na análise.

grupo⁷. Os resultados foram semelhantes aos obtidos nos Testes 1 e 2: não foi encontrada diferença no número de respostas emitidas em cada grupo ($F_{(1,13)} = 4,362$; $p = 0,057$), nem interação entre as condições (M4.3 e T3) e grupos ($F_{(2,26)} = 0,456$; $p = 0,0511$). Foi observado novamente um maior número de respostas na linha de base (M4.3) do que no Teste III ($F_{(1,26)} = 41,339$; $p = 0,001$).

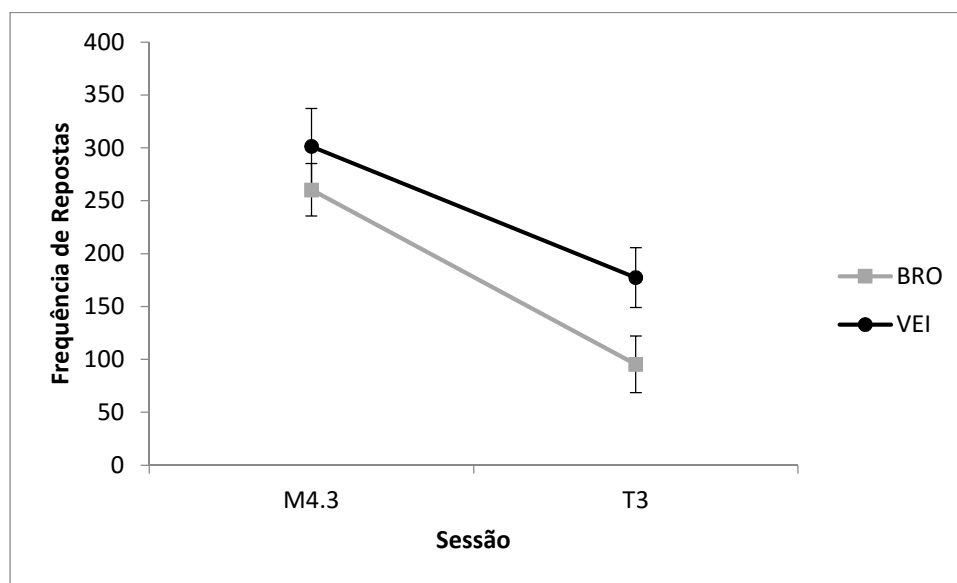


Figura 12: Efeito do tratamento sobre o responder em esquema de FI 20min (SAC). Os dados representam a média de respostas emitidas (\pm EPM) nas sessões de linha de base (M4.3) e experimental (T3) para cada grupo (BRO e VEI).

É importante mencionar que foi encontrada diferença entre o número de acessos à sacarose obtidos na sessão em M4.3 (2, para ambos os grupos) e na sessão de teste (1, para ambos os grupos), porém como será observado a continuação, essa diferença não parece ter afetado as diferenças encontradas entre essas duas condições

Comparação entre as condições

Visando comparar as três condições de manutenção e teste, foi calculada, para cada sujeito, a proporção de mudança da frequência de cada condição T em relação à sua

⁷ É importante mencionar que na sessão M4.3 foi obtido um dado *outlier* (nº de respostas = 814 e nº de reforçadores = 135) no grupo BRO. O responder de S6 foi anômalo não apenas em relação ao grupo, mas também ao desempenho do próprio sujeito ao longo das demais sessões. Sua remoção não acarretou em diferenças nos testes estatísticos, mas trouxe uma alteração importante nas médias, e principalmente, no desvio (de 190,77 com S6 incluso, para 107,12 com sua remoção). Por esse motivo esse dado foi removido da análise estatística.

respectiva linha de base (condições M4). As médias por grupo e condição T são apresentadas na Figura 13. Na figura se observa que na primeira condição de teste a média da proporção do grupo BRO (média = 0,98) foi maior do que a do grupo VEI (média= 0,77). A ANOVA, entretanto, indicou que não houve diferenças significativas entre os grupos ($F_{(1,13)} = 0,666$; $p = 0,429$), nem interação entre as condições e os grupos ($F_{(2,26)} = 0,109$; $p = 0,439$). Por outro lado, análise estatística acusou diferenças significativas entre as condições ($F_{(2,26)} = 7,717$; $p = 0,002$). A análise pos-hoc Tuckey revelou que houve uma diminuição importante entre as proporções de mudança em T3 em relação a T1 ($p < 0,001$) e a T2 ($P < 0,05$), indicando que a retirada do reforçador condicionado teve importante impacto sobre a frequência de resposta de ambos os grupos.

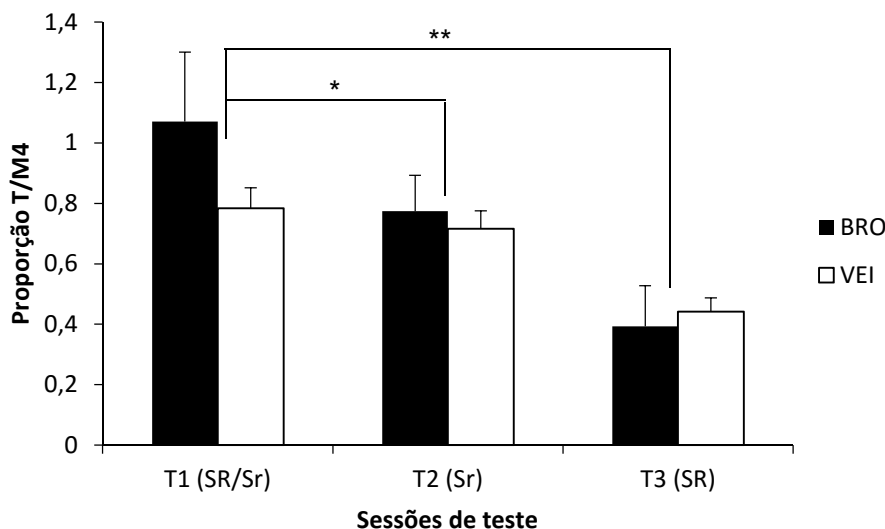
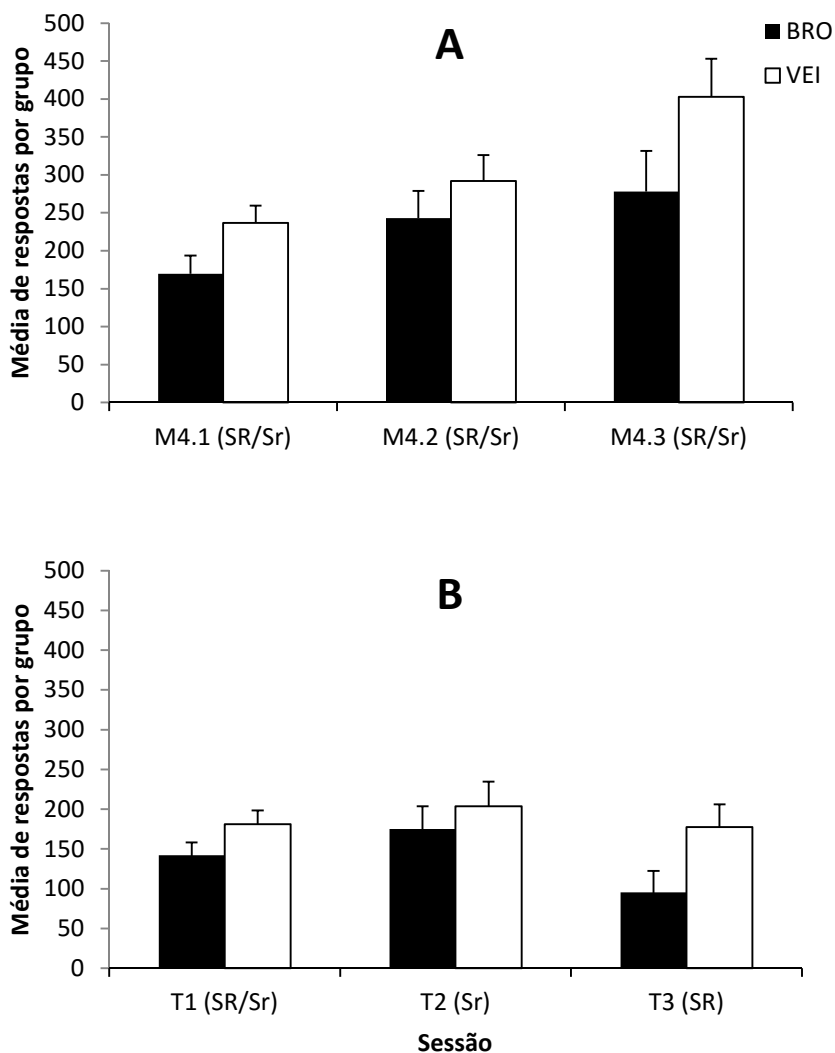


Figura 13: Proporção de mudança entre teste (T1, T2 e T3) e condição de manutenção (M4.1, M4.2 e M4.3). Na condição T1, o esquema FI 20min (FR5:luz) estava em vigor; na condição T2, o reforçador condicionado (Sr) era contingente à resposta sob um esquema FR5 e não havia apresentação do reforçador primário (SR); na condição T3, apenas SR era apresentado sob um esquema FI 20min e Sr não era apresentado. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$

A redução de respostas observadas na Figura 13 foi investigada comparando as frequências de respostas entre os três momentos de linha de base (M4.1, M4.2 M4.3), tendo como variável independente entre-grupos o tratamento (BRO e VEI) e como variável intra-grupo a sessão (M4.1, M4.2 e M4.3) (Figura 14a). Usando as mesmas variáveis, foram também analisadas as frequências de respostas dos T1, T2 e T3 (Figura (14b)).

Na figura 14a pode ser observado que o Grupo VEI respondeu mais vezes na barra do que o grupo BRO em todos os dias de linha de base; o ANOVA indicou que essa diferença foi significativa ($F_{(1,13)} = 5,029$; $p = 0,049$). Ainda revelou que não houve interação entre as linhas de bases e os grupos ($F_{(2,26)} = 0,678$; $p = 0,546$). Por outro lado, a análise indicou que houve aumento progressivo da frequência de respostas ao longo das sessões de linha de base ($F_{(2,26)} = 7,499$; $p = 0,002$).



.Figura 14: Média de respostas emitidas (+EP) por grupo (BRO e VEI) em cada condição de manutenção (M4.1, M4.2 e M4.3) e teste (T1, T2 e T3). Na condição T1, o esquema FI 20min (FR5:luz) estava em vigor; na condição T2, o reforçador condicionado (Sr) era contingente à resposta sob um esquema FR5 e não havia apresentação do reforçador primário (SR); na condição T3, apenas SR era apresentado sob um esquema FI 20min e Sr não era apresentado.

A frequência de repostas emitidas nas sessões de teste (Figura 14b) não seguiu o padrão de aumento observado na Figura 14a, mas se manteve relativamente estável ao longo das sessões ($F_{(1,13)} = 2,018$; $p = 0,153$; para o efeito principal de medidas repetidas), para ambos os grupos ($F_{(2,26)} = 0,568$; $p = 0,573$; para o efeito de interação). Porém, a média do grupo BRO foi significativamente menor do que a do grupo VEI em todas as condições ($F_{(2,26)} = 6,931$; $p = 0,002$)

Os resultados da Figura 14 sugerem que as diferenças na proporção de repostas observadas na Figura 13 em T3 foram função do aumento progressivo da frequência de resposta ao longo das sessões de linha de base (Figura 14a). Esse resultado indica que nas sessões de teste houve alteração no padrão das repostas, especialmente em T2 e T3, caracterizada pela diminuição da frequência de repostas em relação à sua linha de base.

DISCUSSÃO

O Experimento III foi proposto para investigar os efeitos do tratamento com a droga bromazepam sobre o responder por (1) um estímulo condicionado e um estímulo incondicionado, (2) um estímulo condicionado e (3) um estímulo incondicionado. Foram encontradas diferenças entre os grupos de tratamento.

Em primeiro lugar, foi observada uma frequência bruta maior de respostas a no grupo tratado com veículo, em todas as condições. Essa diferença esteve presente desde a primeira sessão, indicando ser um efeito de amostra. O grupo controle também apresentou desempenho bruto estável ao longo das sessões de teste, ao contrário do observado em Wing e Shoaib (2010), no qual foi observada redução em ambas as sessões com remoção de um dos reforçadores (T2 e T3). É possível que o intervalo maior utilizado no presente estudo (20 min, invés de 15 min) tenha contribuído para essa diferença. Com o maior intervalo, a contiguidade da apresentação do reforçador primário foi reduzida, incorrendo em um menor controle deste sobre o responder (Catania, 1999). Esse menor controle pode ter ocasionado menos sensibilidade às alterações nos esquemas vigentes nas diferentes sessões de teste.

Já o grupo experimental, tratado com bromazepam, apresentou diferenças em T3 em relação ao grupo controle, com redução no responder quando somente o reforçador incondicionado estava presente. Isso parece sugerir um efeito diferenciado do tratamento em ambos os tipos de estímulo, condicionado e incondicionado. Deve ser considerado, entretanto, que os estímulos foram apresentados em esquemas diferentes, podendo, então, ser a diferença de efeito causada pelas diferentes interações da droga com os esquemas. Essa hipótese, entretanto, não parece provável, uma vez que Leslie, Shaw, Gregg, McCormick, Reynolds e Dawson (2005) não observaram efeitos diferenciais de clordiazepóxido no responder em extinção de ratos treinos em esquemas de intervalo e de razão (FR5, FI 11s e Fi31s). Adicionalmente, Evenden, Duncan e Ko (2006) observaram um efeito positivo do tratamento, tanto com clordiazepóxido como NS2710 (um agente gabaérgico), sobre o responder por alimento em um esquema conjugado de intervalo fixo (FI 40s) de apresentação de alimento, intercalado por intervalos sinalizados de apresentação de choque em FR20.

Para ambos os grupos, foi observado um aumento progressivo no responder no momento de linha de base. Os dados relativos à linha de base não são relatados em Wing e Shoaib (2010), impossibilitando a verificação de que esses resultados são fruto do

esquema e quantidade de treino. Essa possibilidade, entretanto, é provável, uma vez que o aumento foi observado para ambos os grupos.

CONCLUSÃO

Os experimentos conduzidos buscaram esclarecer quais possíveis efeitos o tratamento com a droga ansiolítica bromazepam poderiam ter sobre o responder por reforçadores incondicionados (1) e condicionados (2) e em dois diferentes tipos de esquema (Razão Progressiva e Segunda Ordem).

(1) Pode-se encontrar na literatura da área de farmacologia comportamental diversas referências à função de diferentes benzodiazepínicos de aumentar o responder por alimentos (Wedeking, 1973; Dantzer, 1976; Dantzer, 1977b; Burke, Miller e Moerschbaecher, 1994 e O'Hare, Kim e Tierney, 2006). Essa característica é descrita como função de aumento no valor reforçador do estímulo, aumento da palatabilidade do estímulo e/ou dessensibilização dos sujeitos em relação a características aversivas do esquema de reforçamento. Os presentes experimentos, por sua vez, produziram resultados aparentemente contraditórios nesse aspecto. Somente os animais do Experimento II apresentaram aumento significativo no seu responder, foi encontrada redução do Experimento I e diferentes efeitos da droga para cada consequência no Experimento III.

Os resultados do Experimento II estão de acordo com os dados obtidos por Dantzer (1976), Dantzer (1977b), Buckland et al (1986) e O'Hare et al (2006). Entretanto, não parecem coerentes com a literatura que indica que essa classe de drogas tem efeitos sedativos importantes sobre o comportamento (King, 1992). Por outro lado, o aumento da resposta observada no Experimento II poderia ser explicado pelos efeitos do benzodiazepínico sobre respostas punidas ou mantidas por esquemas conjugados com apresentação simultânea de apetitivo e aversivo. Kleven e Koek (1999) submeteram o bico de pombos a um esquema múltiplo FR30 (alimento): *conj*t FR30(alimento choque) e observaram diminuição da taxa de resposta no segundo componente; depois, trataram os pombos com várias doses de bromazepam (0,01 a 10 mg/kg) e verificaram que as taxas de respostas no componente conjugado FR30 (alimento choque) aumentavam progressivamente conforme a dose. Resultados semelhantes sobre a taxa de respostas mantidas por procedimento de treinos similares ao usado por Kleven e Koek (1999) foram observadas em ratos e macacos tratados com outros benzodiazepínicos (Geller e Seifter, 1960; Cook e Catania, 1964). Assim, poderia ser postulado que o esquema de razão progressiva, por incorrer no aumento regular de exigência, ou seja, no não reforçamento parcial de respostas previamente reforçadas, tenha um componente aversivo (Coughlin, 1972) e, portanto, seria esperado que o tratamento com o bromazepam aumentasse o

responder sob este esquema. Esse não reforçamento não esteve presente no Experimento III em T1, no qual não foi observado aumento, já que não foram feitas mudanças ao esquema em relação à linha de base, contribuindo para essa hipótese.

Os dados do experimento I indicaram que o bromazepam diminui a resposta mantida pelo esquema de Razão Progressiva. Portanto, não são consistentes com os obtidos no Experimento II. Essa diferença, entretanto, pode ter se devido à diferença de gênero, conforme apontada por Ravenelle, Neugebauer, Niedzielak e Donaldson (2014), pois existem diferenças de gênero no metabolismo e sensibilidade a drogas bem descritas na literatura (Waxman e Holloway, 2009). Também é possível que a falta da fase de adaptação ao procedimento de injeção tenha interferido, uma vez que o procedimento de injeção intraperitoneal é produtor de estresse em ratos, além da solução veículo utilizada com a droga bromazepam (1% Tween, 17% Propilenoglicol e 82% NaCl a 0,9%) ser acídica e oleosa, podendo causar incomodo local após administrada, especialmente com repetidas administrações (Turner, Pekow, Vasbinder & Brabb 2011). Adicionalmente, o efeito sedativo de benzodiazepínicos é bem conhecido (Rastogi, Lapierre e Singhal, 1978 e McKim, 2007), e pode ter sido o efeito mais relevante nos animais submetidos ao Experimento I.

(2) Quanto à eficácia de controle do estímulo condicionado sobre o comportamento e como este foi afetado pelo tratamento, deve ser notado, primeiramente, que em todos os experimentos o estímulo condicionado “luz” foi eficaz em manter a pressão à barra e, no caso do Experimento III, foi mais eficaz do que o estímulo incondicionado atrasado (FI20’).

Só foi encontrada diferença significativa do tratamento com bromazepam sobre o responder por somente o reforçador condicionado no Experimento III, no qual foi encontrada uma redução significativa no responder em relação ao grupo controle quando o mesmo foi retirado. Esse efeito não foi observado nos Experimentos I e II, nos quais não pode ser identificadas diferenças significantes na Fase V. É possível, entretanto, que o procedimento utilizado nos Experimentos I e II tenha ocultado esse efeito. Como não foi feita uma fase de retomada da relação do reforçador incondicionado e condicionado entre as fases IV e V, e por a fase IV se tratar de diversas sessões de quebra dessa relação, é possível que, na ocasião da retirada do reforçador condicionado, o mesmo já apresentava pouca eficácia, evidenciado pelas baixas taxas observadas na última sessão da fase IV para todos os animais. É possível que com o reestabelecimento da relação do estímulo condicionado com o incondicionado, fosse observado um efeito de facilitação da extinção, conforme visto no Experimento III e em Leslie et al (2005).

Foram observadas diferenças nos resultados obtidos em relação ao efeito do tratamento em (1) e (2). Primeiramente, não foi observada diferenças na eficácia do estímulo condicionado em manter comportamento com ou sem tratamento, nos Experimentos I e II, mesmo tendo sido observados efeitos da droga sobre o responder pelo reforçador incondicionado. E, segundo lugar, foi notado um efeito de aceleração na extinção quando o reforçador condicionado foi removido, no Experimento III, mas não quando o reforçador incondicionado foi removido. Como essas diferenças podem ter ocorrido pode ser melhor compreendido em luz da discussão feita por Shahan (2010). Nela, Shahan (2010) aponta a possibilidade de reforçadores condicionados não serem funcionalmente similares a reforçadores incondicionados e, de fato, nem sequer se tratarem de reforçadores no sentido estrito do termo. Possivelmente, esses estímulos tem uma função outra que a de reforçar o comportamento, sendo, dessa maneira, possível que tenham sua função diferencialmente afetada por tratamento farmacológico. Essa hipótese vai de encontro ao observado por Killcross e colegas (1997), Fernando e colegas (2013) e no presente estudo, porém ainda são necessárias mais pesquisas empíricas sobre essa questão.

Por final, é feito claro que maior investigação sobre os efeitos de tratamento com benzodiazepínicos sobre o comportamento é necessária, uma vez que diferenças em seus efeitos entre drogas específicas, esquemas e tipos de estímulo são observados. Especificamente nos experimentos apresentados, seriam de interesse replicações com modificações como a inserção de uma fase de retomada da relação condicionado/incondicionado entre as fases IV e V e modificações no intervalor utilizado no Experimento III, visando uma maior contiguidade da resposta e da apresentação do reforçador incondicionado, para que seus efeitos possam ser melhor observados.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). *Saúde & Economia*. Ano V, número 10. Brasília/DF.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2012). SNGPC: Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados. Recuperado em 31/05/2015, de: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/mapainterativo/mapainterativo.html>

Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. (2008). Abuso e dependência dos benzodiazepínicos, *Projeto Diretrizes*.

Beery, A.K. & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 35(3), 565-572.

Bouton, M.R., Westbrook, R.F., Corcoran, K.A. & Maren, S. (2006). Contextual and Temporal Modulation of Extinction: Behavioral and Biological Mechanisms. *Biological Psychiatry*. 60(4),352-360.

Buckland, C., Mellanby, J. & Gray, J.A. (1986). The effects of compounds related to γ -aminobutyrate and benzodiazepine receptors on behavioural responses to anxiogenic stimuli in the rat: Extinction and successive discrimination. *Psychopharmacology*. 88(3), 285-295

Burke, T.F., Miller, L.G. & Moerschbaeher, J.M. (1994). Acute effects of benzodiazepines on operant behavior and in vivo receptor binding in mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 48(1),69-76.

Catania, A.C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição*. Artmed, 4ª edição, Porto Alegre

Cook, L. & Catania, A.C. (1964). Effects of drugs on avoidance and escape behavior. *Federation Proceedings*. 23, 818-35.

Coughlin, R. C. Jr. (1972). The aversive properties of withdrawing positive reinforcement: a review of the recent literature. *The Psychological Records*. 22, 333-354

Dantzer, R. (1976). Effect of diazepam on performance of pigs in a progressive ratio schedule. *Physiology & Behavior*. 17(1), 161-163

Dantzer, R. (1977a). Effects of Diazepam on Behaviour Suppressed by Extinction in Pigs. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 6, 157-161.

Dantzer, R. (1977b). Behavioral Effects of Benzodiazepines: A Review I *Biobehavioral Review*. 1, 71-86.

Dell'ossoa, B. & Laderb, M. (2013). Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. *European Psychiatry*. 28, 7-20

Dews, P.B. (1955). Studies on behavior. I. Differential sensitivity to pentobarbital of pecking performance in pigeons depending on the schedule of reward. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 113, 393-401.

Dunsmoor, J.E. & Paz, R. (2015). Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. *Biological Psychiatry*. 78(5):336-43.

Evenden, J., Duncan, B. & Ko, T. (2006). A comparison of the effects of psychotomimetics and anxiolytics on punished and unpunished responding maintained by fixed interval schedules of food reinforcement in the rat. *Behavioral Pharmacology*. 17(1),87-99.

Fantino, E. (1969). Choice and rate of reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 12, 723-730.

Fernando, A.B., Urcelay, G.P., Mar, A.C., Dickinson, A. & Robbins, T.W. (2013). Comparison of the conditioned reinforcing properties of a safety signal and appetitive stimulus: effects of d-amphetamine and anxiolytics. *Psychopharmacology*. 227(2).195-208.

Garcia-Mijares, M. & Silva, M. T. A. (2012). Preferência Condicionada de Lugar e Razão Progressiva: dois modelos animais para medir o potencial de abuso de substâncias psicoativas. In: J. Landeira-Fernandez e K. Sameshima. (Org.). *Métodos em Neurociências*. Barueri.

Geller, I. & Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*. 1, 482-492.

Gray, J. A. (1977). Drug effects on fear and frustration: possible limbic site of action of minor tranquilizers. In L. L. Iversen, S. D. Iversen, & S. H. Snyder (Eds.), *Handbook of psychopharmacology. Vol 8. Drugs, neurotransmitters and behaviour* (433-529). New York: Plenum Press.

Herrnstein, R. J. (1964). Secondary reinforcement and rate of primary reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 7, 27-36.

Hodos W. (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science*. 6, 387-394.

Hodos W. & Kalman G. (1963). Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 6, 387–392.

Kelleher, R.T. (1966). Conditioned reinforcement in second-order schedules. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 9(5): 475–485.

Kelleher, R.T. & Gollub, L.R. (1962). A Review of positive conditioned reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 5, 543-597.

Killcross, A.S., Everitt, B.J. & Robins, T.W. (1997). Symmetrical effects of amphetamine and alpha-flupenthixol on conditioned punishment and conditioned reinforcement: contrasts with midazolam. *Psychopharmacology*. 129(2),141-152.

King, D.J. (1992). Benzodiazepine, amnesia and sedation, theoretical and clinical issues and controversies. *Human Psychopharmacology*. 7, 79–87.

Kleven, M.S. & Koek, W. (1999). Effects of benzodiazepine agonists on punished responding in pigeons and their relationship with clinical doses in humans. *Psychopharmacology*. 141, 206–212.

Leslie J.C. & Norwood, K. (2013). Facilitation of extinction and re-extinction of operant behavior in mice by chlordiazepoxide and D-cycloserine. *Neurobiology of Learning and Memory*. 102, 1–6.

Leslie, J.C., Shaw, D., Gregg, G., McCormick, N., Reynolds D.S. & Dawson, G.R. (2005). Effects of drugs that potentiate GABA on extinction of positively-reinforced operant behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28, 229–238.

Leslie, J.C., Shaw, D., Gregg, G., McCormick, N., Reynolds, D.S. & Dawson, G.R. (2005). Effects of reinforcement schedule on facilitation of operant extinction by chlordiazepoxide. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 84(3), 327-338.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. & Tanno, A. P. (2002). Determination of the Estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 62(4). São Carlos.

Mazur, J.E. (2005). *Learning and Behavior*. Sixth Edition.

McCabe, C., Shaw, D., Atack, J.R., Street, L.J., Wafford, K.A., Dawson, G.R., Reynolds, D.S. & Leslie, J.C. (2004). Subtype-selective GABAergic drugs facilitate extinction of mouse operant behavior. *Neuropharmacology*.

McKim, W. A. (2007). *Drugs and Behaviour – An Introduction to Behavioral Pharmacology*. Upper Saddle River. Pearson Education.

Mitchard, T.L. & Klein, S. (2015). Reproductive senescence, fertility and reproductive tumour profile in ageing female Han Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 68(2-3),143-147.

Nikiforuk A & Popik P. (2009). Antidepressants alleviate the impact of reinforcer downshift. *European Journal of Neuropsychopharmacology*.19(1),41-8.

O'Hare, E., Kim, E.M. & Tierney, K.J. (2006). An operant determination of the behavioral mechanism of benzodiazepine enhancement of food intake. *Psychopharmacology*. 187, 138–142.

Prendergast, B.J., Onishi, K.G. & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 40,1-5.

Ravenelle, R., Neugebauer, M.N., Niedzielak, T. & Donaldson, S.T. (2014). Sex differences in diazepam effects and parvalbumin-positive GABA neurons in trait anxiety Long Evans rats. *Behavioural Brain Research*. 270, 68–74.

Reilly, S. (1999). Reinforcement Value of Gustatory Stimuli Determined by Progressive Ratio Performance. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 63(2), 301–311.

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 Neuroscientific Methods*. 66,1–11

Roane, H.S., Lerman, D.C. & Vorndran, C.M (2001). Assessing reinforcers under progressive schedule requirements. *Journal of Applied Behavior Analysis*. 34(2), 145–166.

Roane, H.S. (2008). On the applied use of progressive-ratio schedules of reinforcement. *Journal of Applied Behavior Analysis*. 41(2), 155–161.

Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*. 4(6):624-30.

Shahan, T. A. (2010). Conditioned reinforcement and response strength. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 93(2), 269–289.

Skinner, B.F. (1938). *The behavior of organisms*. Appleton Century Crofts, New York.

Spear, D.J. & Katz, L. (1991). Cocaine and food as reinforcers: effects of reinforcer magnitude and response requirement under second-order fixed-ratio and progressive-ratio schedules. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 56(2), 261–275.

Sutton, M.A. & Beninger, R.J. (1999). Psychopharmacology of conditioned reward: Evidence for a rewarding signal at D1-like dopamine receptors. *Psychopharmacology*. 144, 95-110.

Takahashi, A., Yap, J.J., Bohager, D.Z., Faccidomo, S., Clayton, T., Cook, J.M. & Miczek, K.A. (2009). Glutamatergic and GABAergic modulations of ultrasonic vocalizations during maternal separation distress in mouse pups. *Psychopharmacology*. 204(1):61-71.

Turner, P.V., Pekow, C., Vasbinder, M.A. & Brabb, T. (2011). Administration of Substances to Laboratory Animals: Equipment Considerations, Vehicle Selection, and Solute Preparation. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 50(5): 614–627.

Waxman, D.J. & Holloway, M.G. (2009). Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular Pharmacology*. 76(2):215-28.

Wedeking, P. (1973). Comparison of Chlordiazepoxide and Food Deprivation in Rats on a Fixed-ratio Satiation Schedule. *Physiology and Behavior*. 10, 707-710.

Williams, B. A. (1994). Conditioned reinforcement: Experimental and theoretical issues. *The Behavior Analyst*. 17 (2), 261–285.

Williams, B. A. (1994b) Conditioned reinforcement: Neglected or outmoded explanatory construct? *Psychonomic Bulletin & Review*. 1(4):457-75.

Wing, V.C. & Shoaib, M. (2010). A second-order schedule of food reinforcement in rats to examine the role of CB1 receptors in the reinforcement-enhancing effects of nicotine. *Addiction Biology*. 15(4):380-92.

ANEXO A – Tabela de exigências gerada pela fórmula de Richardson e Roberts (1996), utilizada no esquema de razão progressiva

Tabela A1
Exigências utilizadas na Razão Progressiva

<u>Número do critério</u>	<u>Razão</u>	<u>Respostas Totais reforçadas na sessão</u>
1º	1	1
2º	2	3
3º	4	7
4º	6	13
5º	9	22
6º	12	34
7º	15	49
8º	20	69
9º	25	94
10º	32	126
11º	40	166
12º	50	216
13º	62	278
14º	77	355
15º	95	450
16º	118	568
17º	145	713
18º	178	891
19º	219	1110
20º	268	1378

ANEXO B – Resultados e discussão parcial dos dados obtidos no experimento I, incluindo tratamentos com a droga citalopram e o composto citalopram e bromazepam

RESULTADOS

Fase III - Reforçador Incondicionado

A Figura B1 mostra a média (\pm DP), por grupo, dos percentuais de mudança da linha de base dos BPs obtidos na Fase III. Com administração aguda, houve redução dos BPs obtidos para os grupos de BRO (86%) e CITBRO (80%), enquanto a média de CIT e SAL se mantiveram estáveis (101% e 102%, respectivamente, da linha de base). Variabilidade para os grupos que receberam CIT, entretanto, se mostrou aumentada em relação à SAL e BRO.

Na fase de administração crônica, houve redução da média de grupo dos BPs para todos os grupos de tratamento. A redução foi mais marcada para os animais dos grupos que receberam Citalopram sozinho ou em combinação com Bromazepam (CIT de 101% a 85% e CITBRO de 80% a 60%). SAL e BRO apresentaram redução similar na média de grupo dos BPs, porém a média para SAL se manteve próxima da linha de base (BRO de 86% a 80% e SAL de 102% a 94%). Novamente, a variabilidade para os grupos que receberam CIT foi maior do que para os outros grupos.

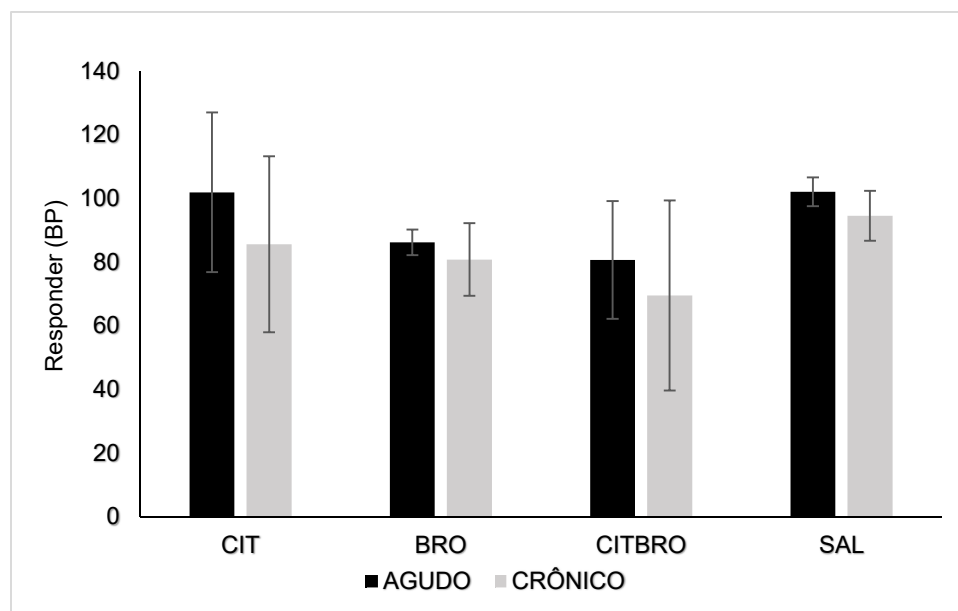


Figura B1: Médias dos BPs (\pm DP) obtidos para administração aguda e crônica, em relação à linha de base, para cada grupo de tratamento.

Fase IV - Reforçador Condicionado

A Figura B2 apresenta a curva média de cada grupo de tratamento durante a Fase IV, com os dados convertidos em porcentagem em relação à linha de base. O Grupo SAL apresentou a maior média de responder no primeiro dia de sessão, aproximadamente 80% da linha de base, enquanto BRO teve esse valor em aproximadamente 60% e CIT e CITBRO obtiveram ambos aproximadamente 40%. CIT e CITBRO também apresentaram curvas médias com uma redução do responder mais acelerada do que SAL e BRO, que apresentaram acelerações similares a partir da segunda sessão.

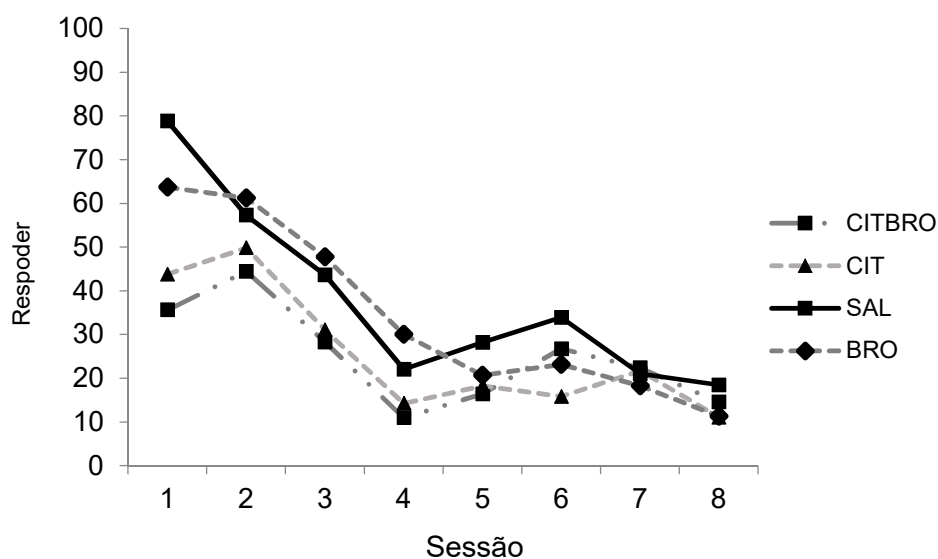


Figura B2: Curvas médias de responder para cada grupo de tratamento, por sessão. Valores médios convertidos para porcentagem da linha de base.

Observação das curvas individuais (Figura B3) revelou que o padrão de responder para os ratos do grupo de SAL (Figura B3a) foi o mais homogêneo de todos os grupos, apresentando um padrão de redução do responder em torno de 20% por sessão para todos os sujeitos.

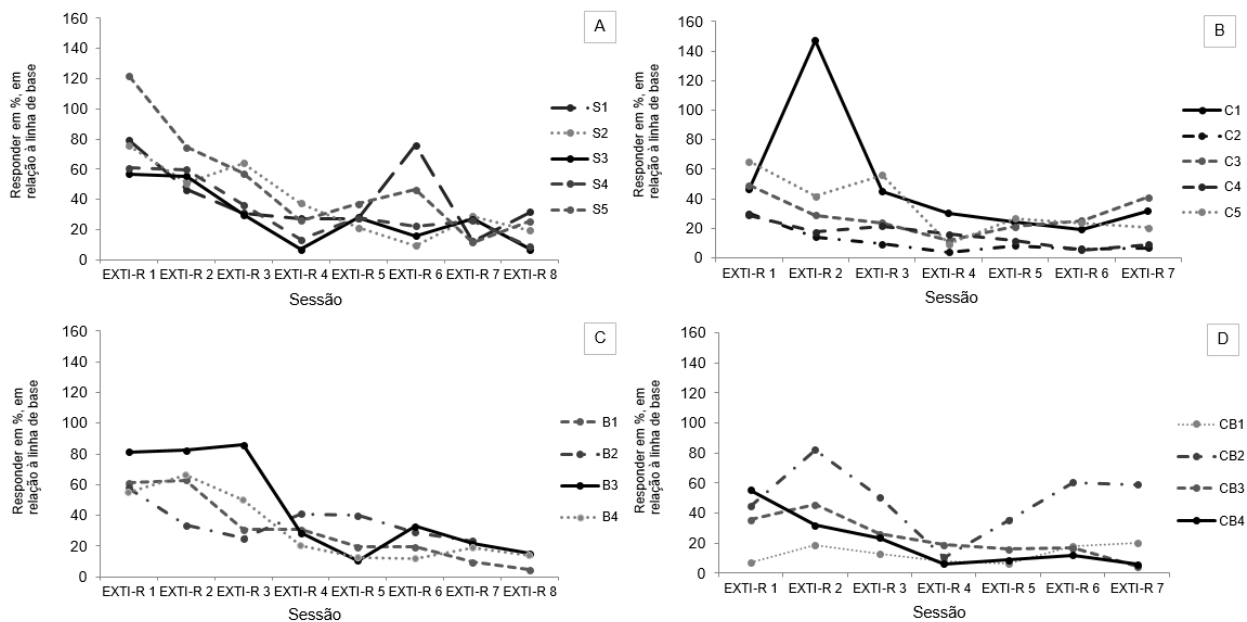


Figura B3. Curvas de resposta individuais por sessão, para cada grupo. S representa os sujeitos tratados com Salina, B com Bromazepam, C com citalopram e CB com a combinação de Citalopram e Bromazepam.

O desempenho dos animais do grupo CIT (Fig. B3b) foi menos homogêneo do que o grupo SAL. Todavia, a maioria dos valores na primeira sessão foram menores, e a redução do responder mais rápida, do que observado nos animais do grupo SAL.

Os animais do grupo BRO (fig. B3c) também não apresentaram desempenhos homogêneos. O sujeito B2 apresentou um processo de extinção mais rápido que os demais sujeitos do grupo, que, por sua vez, obtiveram um desempenho mais similar ao grupo de Salina, com uma menor aceleração das curvas, em especial nas primeiras sessões de extinção.

Por último, o grupo CITBRO (Fig. B3d) apresentou a maior variabilidade de todos os grupos experimentais. A redução do responder de todos os indivíduos, menos CB3, se deu de maneira mais rápida, desde a primeira sessão, do que do grupo SAL.

De maneira geral, os grupos que receberam Citalopram apresentaram maior aceleração nas curvas de extinção, tanto em relação ao grupo Salina, como ao grupo Bromazepam, que pareceu ter pouco ou nenhum efeito no comportamento nesta fase.

Fase V – Extinção

Devido à variabilidade intra-grupo apresentada nesta fase, apenas serão apresentados os dados individuais.

Como mostrado na Figura B4, metade do número de sujeitos exibiu o padrão clássico de jorro de respostas na primeira sessão de extinção (após a remoção do condicionado), isto é, um aumento inicial do responder para além da linha de base. A outra metade mostrou diminuição abrupta da frequência de respostas (para quase 0% na primeira sessão). Essas diferenças não parecem ter estado correlacionadas com o tratamento.

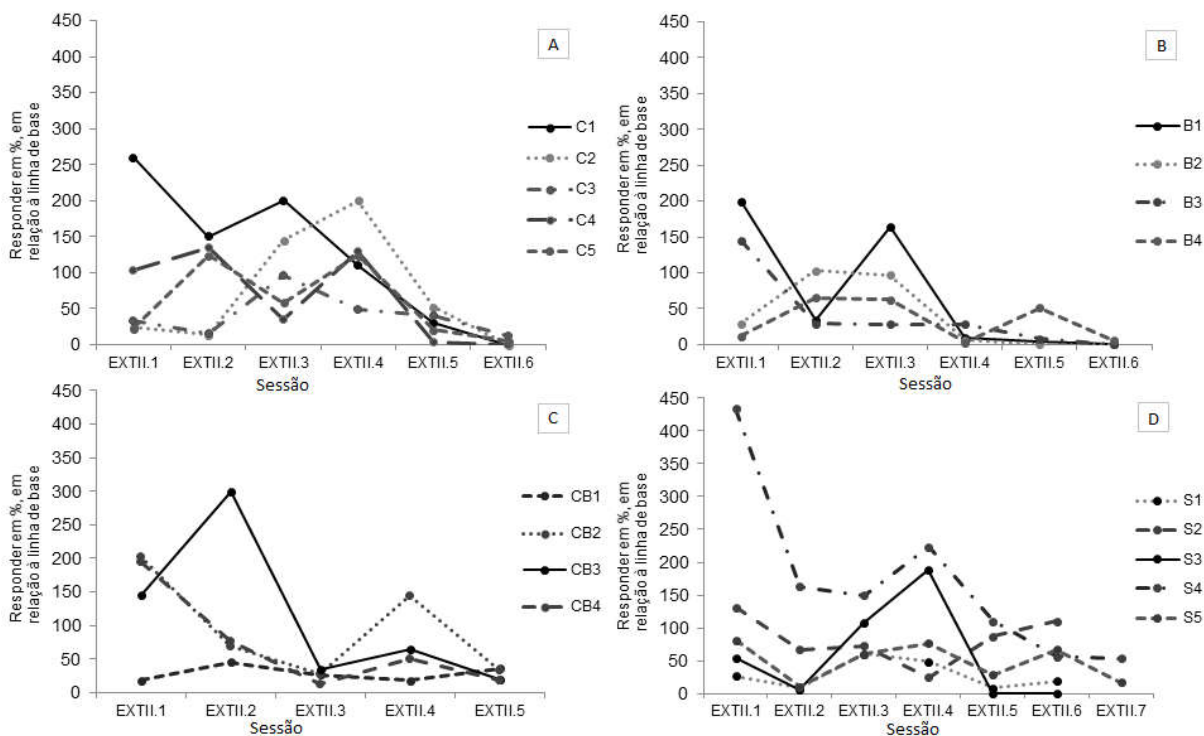


Figura B4. Curvas de resposta individuais por sessão, para cada grupo. S representa os sujeitos tratados com Salina, B com Bromazepam, C com citalopram e CB com a combinação de Citalopram e Bromazepam.

DISCUSSÃO INICIAL

Dados preliminares indicam que as drogas escolhidas não tiveram efeito de aumentar o valor reforçador do estímulo condicionado nem do estímulo incondicionado.

Os dados da primeira fase experimental mostraram redução do BP após a administração crônica de citalopram, bromazepam e do composto de ambas as drogas. Portanto, parece que ambas as drogas tiveram efeito, sendo a dosagem suficiente para afetar o comportamento. Isso fica especialmente claro com a inspeção do grupo Salina, que, de maneira homogênea, não foi afetado pelas administrações de veículo e obteve desempenho diferente do observado para os outros grupos.

Quanto à avaliação do valor reforçador do estímulo condicionado, novamente foi encontrado um padrão estável para o grupo de salina, com redução similar entre os indivíduos. O processo de extinção do responder dos animais do grupo que recebeu citalopram foi, em geral, mais rápido do que dos animais do grupo que receberam apenas salina, indicando redução do valor reforçador do reforçador condicionado. Esse efeito também observado nos animais do grupo que recebeu o tratamento composto (CITBRO). Já os animais do grupo Bromazepam apresentaram curvas muito similares às do grupo salina, o que sugere que não teve efeito sobre o valor do reforçador condicionado.

Em resumo, o citalopram e sua combinação com bromazepam parecem ter diminuído o valor tanto do reforçador primário quanto do condicionado. Já o bromazepam parece ter diminuído o valor do reforçador primário, e não teve efeito sobre o condicionado. O efeito do bromazepam é contrário ao esperado já que a literatura aponta uma função de aumento do valor reforçador primário com benzodiazepínicos (Dantzer, 1976), assim como de aumento da resistência à extinção (Buckland, Melamby e Gray, 1986), não observado na fase IV ou V. Algumas hipóteses podem ser levantadas sobre o porquê da diferença dos dados aqui relatados com os encontrados na literatura. Em primeiro lugar, os animais utilizados foram fêmeas, ao contrário da maioria dos estudos conduzidos na área (Beery e Zucker, 2011). É possível que alguma diferença metabólica ou de processamento da droga ocasionasse que o efeito de drogas em fêmeas fosse diferente do que em machos, já que são conhecidas diferenças importantes quanto à reação para drogas entre os sexos (Waxman e Holloway, 2009). Entretanto não é muito provável que essa diferença se deva ao ciclo estral, já que esse parece não afetar a variabilidade do comportamento (Prendergast, Onishi e Zucker, 2014). Consistente com esses dados, e a despeito das

limitações indicadas nos resultados, as medidas analisadas do ciclo estral não mostraram covariação entre o responder e as fases estrais.