

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**

**NEUROCIÊNCIAS**

**Condicionamento ao local induzido por etanol em ratos: Revisão metodológica e estudo experimental**

**DOUGLAS MARQUES DA SILVA**

Dissertação de Mestrado

PORTO ALEGRE

2017

Douglas Marques da Silva

**Condicionamento ao local induzido por etanol em ratos: Revisão metodológica e estudo experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.


Orientadora: Profa. Dra. Mirna Bairy Leal

Co-Orientador: Prof. Dr. José Inácio Lemos Monteiro Carvalho

PORTO ALEGRE

2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Piter Kehoma Boll, , minha mansidão, que esteve comigo em todas as etapas deste projeto e, em todas elas, foi fundamental para que eu pudesse realiza-lo: 'nkh-i, eu não tenho palavras para expressar o quanto sou grato a ti por me proporcionares a felicidade que me proporcionas e sempre, sempre, sempre seres tão amável e atencioso.

Agradeço à minha mãe, Ângela Maria Lobato Marques, e ao meu irmão, Paulo Miguel Marques Dionísio, por me ensinarem constantemente que tudo que se faz nessa vida, se faz por amor.

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Mirna por ter aceitado me orientar no mestrado quando entrei em contato com a mesma em finais de 2014 acerca da seleção de mestrado de 2015 do PPGNEURO. Também agradeço à mesma por ter feito de todo o possível para que esse projeto fosse executado da melhor maneira possível, por ter me dado toda a liberdade e confiança necessárias à realização do mesmo e por ter me acolhido tão aberta e prontamente em seu grupo de pesquisa, fazendo com que eu me sentisse com pertença, certo e seguro.

Agradeço ao Prof. Inácio por todos esses anos de amizade, de trabalho, apoio e pelas sempre acaloradas discussões científicas. Se me for possível dizer que adquiri repertório científico com o mínimo de consistência, em grande parte essa aquisição decorre de nossa relação, mesmo que por muitas vezes entremos em atrito: sua contribuição à minha formação acadêmica é indelével.

Agradeço à Edivanda Souza Viana (a amada Vandinha) e à Camila Armani (a amada Camiluda), bioteristas responsáveis pelos Biotérios Setoriais do ICBS, pela grande e forte amizade construída e, especialmente, pelo esmero no cuidado, respeito e prezar dos e aos animais de laboratório sob suas responsabilidades: sem essa integridade profissional, presente mesmo quando se encontravam sobrecarregadas de trabalho, a pesquisa experimental aqui realizada não seria possível.

Agradeço imensamente aos membros de nosso grupo de pesquisa: Lucas, Nayana, Bruna, Marina, Janaina e Ana Cláudia pelas conversas, ajudas e risos trocados e, em especial, agradeço à Prof. Dr<sup>a</sup> Eliane Dallegrave pelo apoio constante, lúcido e bem-humorado.

Agradeço às e aos colegas de pós-graduação que se tornaram queridos amigos e queridas amigas: Giana, Charlanne, Mirelle, Flavinha, Louiziana, Pati, Gabi e Jadier. Em especial, agradeço à Flavinha por ter cedido seu tempo e tido a coragem de ser *beta reader* desse ensaio.

Aos queridos amigos de longa data, irmãos e irmãs de escolha e coração, Felinto Maués, Silvia Letícia Maués, Júnior Silva e Giovanni Torres: obrigado por todo o apoio, compreensão, conversas, discussões pessoais e científicas, risos e choros ao longo desses muitos anos.

Agradeço às mulheres de minha família paterna e materna que sempre foram e são fortalezas e enfrentam até hoje adversidades mil, além da conta, não se calam ou submetem e ainda encontram tempo e disposição para sorrirem, viverem e amarem!

Também devo estender meus agradecimentos *In Memoriam* aos queridos amigos Érico Barreto e Márcio da Silva Monteiro, e, em especial, à minha avó materna, Natalice Cardoso Pantoja, e a meu pai, Enoque José Dionísio. Não possuo palavras para exprimir o quão sou grato e feliz de ter participado da existência de vocês e vocês da minha.

Por último, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de Bolsa sem a qual eu dificilmente conseguiria cursar o mestrado.

## Sumário

Lista de abreviaturas .....	5
Lista de Figuras .....	6
Lista de Tabelas .....	7
Resumo .....	8
Abstract.....	9
Apresentação .....	10
Capítulo 1: Revisão Metodológica .....	13
1 Introdução .....	13
2 Materiais e Métodos .....	15
2.1 Busca, aquisição, classificação e seleção de artigos e de experimentos.....	15
2.2 Extração de dados .....	18
2.2.1 Protocolo de extração de dados e dados extraídos .....	18
2.2.2. Definições gerais e de dados extraídos.....	20
2.3 Organização e análise de dados extraídos .....	24
3 Resultados e Discussão.....	25
3.1. Animal-Modelo .....	25
3.1.1 Linhagens .....	25
3.1.2 Alocação, idade, peso e ciclo circadiano.....	34
3.2 Aparatos de MCL .....	42
3.3 Arranjos experimentais, de condicionamento e de teste.....	54
3.3.1. Protocolos de MCL.....	54
4 Conclusões.....	74
Capítulo 2: Estudo Experimental.....	77
1 Introdução .....	77
2 Objetivos.....	79
2.1 Objetivo Geral .....	79

2.2 Objetivos Específicos .....	79
3 Materiais e Métodos .....	80
3.1 Sujeitos experimentais .....	80
3.2 Aparatos experimentais .....	80
3.3 Protocolos dos experimentos de condicionamento.....	80
3.3.1 Linha de base (pré-condicionamento) .....	81
3.3.2 Condicionamento.....	81
3.3.3 Teste (pós-condicionamento) .....	82
3.4 Análise estatística .....	82
3.5 Considerações bioéticas.....	83
4 Resultados.....	83
4.1 Experimentos 1 e 2 .....	83
4.2 Experimentos 3 e 4 .....	88
4.3 Experimento 5 .....	91
5 Discussão e Conclusões.....	93
Referências .....	97
Anexo A.....	109
Apêndice A .....	110
Apêndice B .....	115
Apêndice C .....	117

## Lista de Abreviaturas

A	Alocação nas gaiolas-viveiro
ACE	Artigos Comparativos Etanol
ACL	Aversão condicionada ao local
ADE	Artigos Dúbios Etanol
AME	Artigos Misturados Etanol
ANOVA	Análise de variância
ASE	Artigos Somente Etanol
AshE	Artigos Sham Etanol
$C \leq 10$	Protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões
$C \geq 12$	Protocolos de condicionamento com 12 ou mais sessões
$C > 75$	Aparatos de MCL com comprimento menor que 75 cm e largura igual ou maior que 20 cm
$C < 75$	Aparatos de MCL com comprimento maior que 75 cm e largura igual ou maior que 20 cm
CC	Câmara central/de acesso
CPE	Câmara pareada com administração de etanol
CNPE	Câmara não pareada com administração de etanol
CS	Estímulo condicional
H	Ratos da linhagem Holtzman
L	Ratos da linhagem Lister
$L < 20$	Aparatos de MCL com largura inferior a 20 cm
L-E	Ratos da linhagem Long-Evans
P	Ratos da linhagem <i>Alcohol Preferring</i>
PCL	Preferência condicionada ao local
MCL	Modelo de condicionamento ao local
NP	Ratos da linhagem <i>Acohol Non-Preferring</i>
NS	Falha de condicionamento/resultado não significativo
S-D	Ratos da linhagem Sprague-Dawley
US	Estímulo incondicional
W	Ratos da linhagem Wistar
W (shoe)	Ratos da linhagem Wistar (shoe)

## Listas de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Esquema temporal do protocolo de MCL e de protocolos associados. ....	22
<b>Figura 1.2</b> - Resultados de protocolos de condicionamento sem pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e as linhagens Holtzman e Sprague-Dawley de <i>Rattus norvegicus</i> .....	27
<b>Figura 1.3</b> - Resultados de protocolos de condicionamento sem pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e a linhagem Wistar de <i>Rattus norvegicus</i> . ....	28
<b>Figura 1.4</b> - Resultados de protocolos de condicionamento com pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e a linhagem de <i>Rattus norvegicus</i> empregada. ....	31
<b>Figura 1.5</b> - Resultados reportados em experimento sem pré-exposição, estratificados segundo a linhagem de <i>Rattus norvegicus</i> , a alocação relatada e o tipo de protocolo de condicionamento. ....	37
<b>Figura 1.6</b> - Visão de plantas baixas de diferentes aparatos de MCL com etanol em ratos. ...	43
<b>Figura 1.7</b> - Relações entre dose, dimensões dos aparatos, número total de sessões de habituação e tipo de habituação nos resultados reportados para a via de administração intraperitoneal em linhagens albinas heterogênicas de <i>Rattus norvegicus</i> .....	70
<b>Figura 2.1</b> - Tempo de permanência individual na câmara pareada com etanol (CPE) e na câmara não pareada com etanol (CNPE) de acordo com os grupos e horários nos experimentos 1 e 2. ....	84
<b>Figura 2.2</b> - Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE segundo organização conjunta e em separado dos dados dos animais tratados com etanol ou com salina dos experimentos 1 e 2. ....	86
<b>Figura 2.3</b> - Tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC na sessão de teste segundo intervalos cumulativos de 5 minutos. ....	87
<b>Figura 2.4</b> - Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE segundo organização conjunta e em separado dos dados dos animais tratados com etanol ou com salina dos experimentos 3 e 4. ....	90
<b>Figura 2.5</b> - Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste dos animais tratados com etanol ou com salina do experimento 5. ....	92
<b>Figura A.1</b> Carta de aprovação do projeto ao qual o estudo experimental é vinculado.....	106



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Artigos organizados de acordo com as relações etanol-outras-drogas estudadas no condicionamento ao local induzido por etanol. ....	17
<b>Tabela 1.2</b> - Experimentos e resultados reportados por linhagem de <i>Rattus norvegicus</i> . ....	26
<b>Tabela 1.3</b> - Dados referentes ao animal-modelo utilizado, organizados por linhagem e pela alocação dos animais, subdivididos por tipo de protocolo de condicionamento e pela ausência/presença de fase de pré-exposição ao etanol, seguidos dos resultados experimentais reportados. ....	35
<b>Tabela 1.4</b> - Resultados reportados por linhagem de <i>Rattus norvegicus</i> segundo alocação nas gaiolas-viveiro. ....	37
<b>Tabela 1.5</b> - Dados dos aparatos de MCL organizados por tipo de alocação nas gaiolas-viveiro e pelo comprimento dos aparatos, subdivididos por tipo de protocolo de condicionamento e pela ausência/presença de fase de pré-exposição ao etanol, seguidos dos resultados experimentais reportados. ....	45
<b>Tabela 1.6</b> - Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe $L < 20$ . ....	55
<b>Tabela 1.7</b> - Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe $C < 75$ . ....	58
<b>Tabela 1.8</b> - Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe $C > 75$ . ....	63
<b>Tabela 1.9</b> - Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em outros aparatos. ....	67
<b>Tabela 2.1</b> - Arranjos de MCL investigados e número de sujeitos utilizados. ....	81
<b>Tabela 2.2</b> - Teste de normalidade dos experimentos 1 e 2 .....	84
<b>Tabela 2.3</b> - Teste de normalidade dos experimentos 3 e 4 .....	88
<b>Tabela 2.4</b> - Teste de normalidade do experimento 5.....	91
<b>Tabela B.1</b> - Dados da fase de pré-exposição a tratamentos <i>sham</i> e ao etanol.....	115
<b>Tabela C.1</b> - Dados da fase de exposição continuada a tratamentos <i>sham</i> e ao etanol .....	117

## Resumo

Desde a década de 1950, o modelo de condicionamento ao local (MCL) tem sido usado no estudo dos efeitos motivacionais de fármacos em ratos. Apesar do uso frequente do MCL no estudo de variáveis farmacológicas, ambientais, genéticas e neurofisiológicas envolvidas no controle do comportamento de busca por etanol, as condições sob as quais o etanol induz condicionamento ao local em ratos continuam pouco esclarecidas. Neste trabalho, foi realizada revisão metodológica de 262 experimentos reportados em 62 artigos de pesquisa em MCL com etanol em ratos. A revisão mostra que a produção de preferência condicionada ao local (PCL), aversão condicionada ao local (ACL) e de falha de condicionamento (NS) aparenta ser majoritariamente decorrente de interações de cinco fatores: (a) o sistema de armazenamento nas gaiolas-viveiro; (b) o aparato de MCL utilizado; (c) a dose de etanol administrada; (d) o número de sessões de habituação e (e) o número de sessões de condicionamento (protocolo curto de condicionamento = 10 ou menos sessões de condicionamento; protocolo longo de condicionamento = 12 ou mais sessões de condicionamento). Desses fatores, o aparato aparenta ser o mais preponderante à produção de PCL, ACL e NS: (1) aparatos com comprimento  $\leq 75$  cm e largura  $> 20$  cm têm maior probabilidade de produzirem PCL em protocolos curtos de condicionamento quando a dose de etanol é baixa (0,5 a 1,0 g/kg, ip; 1,0 a 1,5 g/kg, ig); (2) aparatos com comprimento  $> 75$  cm e largura  $\geq 20$  cm tendem a produzir NS e ACL em protocolos curtos de condicionamento de forma dependente da dose de etanol administrada, sendo que quanto maior a dose, maior a probabilidade de ACL; (3) aparatos com comprimento  $> 75$  cm e largura  $\geq 20$  cm tendem a produzir PCL somente quando protocolos longos de condicionamento são implementados; (4) aparatos com largura  $< 20$  cm só produzem NS e ACL, independentemente dos protocolos de condicionamento implementados e das doses de etanol administradas. No trabalho experimental decorrente foram estudadas interações de variáveis que a revisão não pôde alcançar. Os resultados demonstram que interações entre (a) horário de condicionamento, (b) presença/ausência de fase de habituação no protocolo e (c) intervalo interfásico também ocorrem na produção de NS ou de PCL. De acordo com o horário, o mesmo protocolo de condicionamento sem fase habituação produz NS ou PCL (horários de 07:50-09:50 e 10:30-12:30, respectivamente), (2) a inserção de fase de habituação no horário de 10:30-12:30 produz NS e (3), mantendo a fase de habituação no mesmo horário, o aumento do intervalo interfásico de 24 para 48 horas reestabelece PCL. Conclui-se que o etanol não é menos reforçador que outras drogas de abuso no MCL, mas é mais sensível a outras variáveis.

**Palavras-chave:** revisão metodológica; condicionamento clássico; condicionamento ao local.

## Abstract

Since the 1950s, the Place Conditioning Paradigm (PCP) has been used in the study of the motivational effects of drugs in rats. Despite the frequent use of PCP in the study of pharmacological, environmental, genetic e neurophysiological variables involved in the control of ethanol search behavior, the conditions under which ethanol induces place conditioning in rats remain unclear. In this work, a methodological review of 262 experiments was carried out in 62 research articles on PCP with ethanol in rats. The review shows that the production of conditioned place preference (CPP), conditioned place aversion (CPA) and conditioning fails (CF) appears to be mostly due to interactions of five factors: (a) the cage housing system, (b) the PCP apparatus used, (c) the dose of ethanol administered, (d) the number of habituation sessions and (e) the number of conditioning sessions (short conditioning protocol = 10 or fewer conditioning sessions; long conditioning protocol = 12 or more conditioning sessions). Of these factors, the apparatus appears to be the most preponderant to the production of CPP, CPA, and CF: (1) apparatuses with a length  $\leq 75$  cm e width  $> 20$  cm are more likely to produce CPP in short conditioning protocols when the ethanol dose is low (0.5 to 1.0 g/kg, ip, 1.0 to 1.5 g/kg); (2) apparatuses with a length  $> 75$  cm e width  $\geq 20$  cm tend to produce CF e CPA in short conditioning protocols depending on the dose of ethanol administered: the higher the dose, the greater the probability of PCA; (3) apparatus with a length  $> 75$  cm e width  $\geq 20$  cm tend to produce PCL only when long conditioning protocols are implemented; (4) devices with width  $< 20$  cm only produce NS e ACL, regardless of the conditioning protocols implemented and the doses of ethanol administered. The resulting experimental work evaluated interactions of variables that the review could not reach. The results demonstrate that interactions between (a) conditioning schedule, (b) absence/presence of habituation phase in the PCP protocol and (c) interphase interval also occur in CF or CPP production. According to the schedule, the same protocol of conditioning without habituation phase produces CF or CPP (schedules: 07:50 to 09:50 e 10:30 to 12:30, respectively), (2) the insertion of habituation phase in the 10:30-12:30 experiment produces CF, and (3), maintaining the habituation phase at the same time, increasing the interphase interval from 24 to 48 hours reestablishes CPP. In conclusion, ethanol is not less reinforcing than other drugs of abuse in the PCP, but its reinforcing property is more susceptible to the effects of other variables.

**Keywords:** methodological review; classical conditioning; place conditioning.

## APRESENTAÇÃO

Desde sua introdução na década de 1950, o modelo de condicionamento ao local (MCL) se tornou uma alternativa popular ao modelo de autoadministração de drogas e alcançou o *status* de um dos instrumentos mais utilizados na pesquisa pré-clínica em psicofarmacologia de drogas de abuso (Tzschentke, 1998; 2007). Sua popularidade provém em parte (a) da facilidade de composição do aparato, (b) da simples mensuração de resposta comportamental claramente definida (tempo de permanência na câmara do aparato pareada com a administração da droga) em relação (1) ao constructo avaliado (motivação de comportamento de busca/procura pela droga) e (2) ao paradigma de aprendizagem empregado (condicionamento clássico), além (c) da interpretação aparentemente simples do comportamento modelo (preferência/aversão condicionada ao local). Adicionalmente, (d) a resposta mensurada aparenta ser sensível a grande variedade de manipulações genéticas, fisiológicas, farmacológicas e de experiência prévia ao condicionamento, e (e) é considerada suficientemente confiável em condições padronizadas de testagem (Bozarth, 1987; Carboni & Vacca, 2003; Carlezon, 2003; Prus, James, & Rosecrans, 2009; van der Kooy, 1987). Assim, a facilidade de implementação, a quantificação simples e a ampla possibilidade de aplicação aparentam ser os principais determinantes da popularidade do MCL.

Não obstante o argumento construído acima, o uso do MCL para o estudo de propriedades motivacionais do etanol em ratos continua controverso. Diferentes grupos de pesquisa têm reportado inabilidade de demonstrar consistente efeito de condicionamento a partir de contextos previamente associados com etanol. Por exemplo, de 12 trabalhos publicados na década de 1990, utilizando administração intraperitoneal de soluções de etanol em ratos, apenas 3 relataram experimentos que estabeleceram preferência condicionada sem a necessidade de exposição dos animais ao etanol dias antes do condicionamento; 4 demonstraram preferência condicionada somente quando ocorreu exposição ao etanol dias antes do condicionamento; 4 relataram ausência de condicionamento e 5 reportaram aversão condicionada como resultado dos experimentos (Biała & Kotlinska, 1999; Biała & Lagwiński, 1996a; Biała & Lagwiński, 1996b; Bieńkowski, Kuca, & Kostowski, 1995; Bormann & Cunningham, 1997; 1998; Bozarth, 1990; Ciccocioppo, Panocka, Frolidi, Quitadamo, & Massi, 1999; Cunningham, 1981; Cunningham & Niehus, 1993; Cunningham, Niehus, & Noble, 1993; Holloway, King, Bedingfield, & Gauvin, 1992).

Frente a isso, diversas explicações foram propostas acerca da baixa reprodutibilidade de resultados no MCL com relação às propriedades motivacionais do etanol em ratos. Por

exemplo, considerações foram feitas (a) acerca das relações temporais da administração e dos níveis sanguíneos de etanol em referência ao pareamento dos estímulos condicional e incondicional, (b) acerca da duração das sessões de condicionamento, (c) do padrão de exposição ao etanol ao longo das sessões, (d) do histórico de contato do animal com a droga e (e) das possíveis propriedades aversivas associadas com a administração involuntária (Asin, Wirsthafter, & Tabakoff, 1985; Bozarth, 1990; Fidler, Bakner, & Cunningham, 2004; Reid, Hunter, Beaman, & Hubbell, 1985). Outros sugeriram que (f) o etanol pode ser somente um reforçador secundário, (g) pode simplesmente aumentar as propriedades reforçadoras de reforçadores primários<sup>1</sup>, tais como alimento, ou ainda (h) haver diferenças de sensibilidade às propriedades aversivas e reforçadoras do etanol entre ratos e camundongos (Cunningham *et al.*, 1993; Stewart & Grupp, 1981; Van der Kooy, O'Shaughnessy, Mucha, & Kalant, 1983). Não ao acaso, este cenário levou alguns pesquisadores a denominar como “estorvo” (*nuisance*) o emprego do MCL no estudo de propriedades motivacionais do etanol (Swerdlow, Gilbert, & Koob, 1990), visto “(...) a necessidade de uso de múltiplos grupos controle, de grande número de indivíduos, de grande número de doses de etanol, da falta de conhecimento de intervalos ou durações de condicionamento ótimos e de um fraco efeito reforçador do etanol na melhor das hipóteses” (Swerdlow *et al.*, 1990, p. 421, tradução livre).

Visto isso, é interessante notar que, após 4 décadas de uso deste modelo para o estudo de comportamentos de busca por etanol, não tenha sido realizada ou mesmo proposta revisão que avalie as metodologias implementadas na literatura até este momento (ver capítulo 1). Tal revisão poderia esclarecer em parte as variáveis envolvidas na diversidade de resultados encontrados na literatura e dar subsídio a programas de pesquisa experimental. Esses, por sua vez, poderiam esclarecer quais relações de variáveis independentes, de procedimento e de análise influenciam diferencialmente os resultados do condicionamento, visto que estas diferentes variáveis poderiam ser investigadas sob condições similares, levando-nos a desvendar e a sanar o tal “estorvo”.

Assim sendo, neste trabalho decidiu-se explorar esses aspectos e os resultados do mesmo são apresentados na forma de capítulos. No capítulo 1 apresenta-se revisão metodológica da literatura do MCL com etanol em ratos. Nele, argumentos a respeito da

---

<sup>1</sup> Reforçadores primários são estímulos que apresentam propriedades reforçadoras (i.e., no condicionamento operante, aumentam a frequência da resposta; no condicionamento clássico, aumentam a magnitude e a duração da resposta e diminuem a latência para a resposta) sem que aprendizagem seja necessária para tanto. Reforçadores secundários são estímulos que adquirem propriedades reforçadoras a partir do pareamento com reforçadores primários (Catania, 1999).

necessidade da revisão metodológica são elaborados, procedimentos de busca, aquisição, seleção, classificação e avaliação de artigos de relatos experimentais são apresentados, e variações nos protocolos são examinadas e discutidas segundo 3 categorias metodológicas gerais: (a) animal-modelo, (b) aparatos de MCL e (c) arranjos experimentais, de condicionamento e de teste. Conclui-se que as variações ocorrem em todas as categorias gerais, estão presentes especialmente em aparatos de 3 câmaras por conta do maior comprimento desses e são combinadas de forma assistemática na maioria dos estudos (exceção pode ser encontrada na variação de doses de etanol administradas).

A partir do trabalho de revisão, algumas variáveis foram escolhidas para compor a investigação experimental apresentada no capítulo 2. Por conta da indisponibilidade de outras linhagens de *Rattus norvegicus*, do pequeno orçamento e do curto prazo, não foi possível realizar investigação maior e mais complexa que a ora apresentada. Por exemplo, pretendia-se realizar comparação de resultados advindos de aparatos com 2 e com 3 câmaras e de animais de diferentes faixas etárias e de diferentes linhagens (em especial, das linhagens albinas heterogênicas Wistar, Sprague-Dawley e Holtzman) em pelo menos 1 dos aparatos neste estudo. Ainda assim, na composição do estudo foram escolhidas representantes das categorias *animal-modelo* e *arranjos experimentais e de condicionamento*. Essas variáveis são: (a) período do ciclo-claro escuro, (b) presença/ausência de sessão de linha de base e (c) intervalos entre sessões e interfásicos. Como pode ser visto no capítulo 2, a avaliação destas variáveis já demonstra que o emprego do MCL não é de tão simples interpretação como posto em revisões gerais ou introdutórias do modelo.

## CAPÍTULO 1: REVISÃO METODOLÓGICA

### 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980, o MCL (na tradução inglesa recente, *Place Conditioning Paradigm*) tem sido utilizado extensivamente no estudo experimental das propriedades motivacionais de eventos farmacológicos e não farmacológicos (Schechter & Calganetti, 1993; 1998; Tzschentke, 1998; 2007). A partir de meados daquela década, a vasta literatura gerada vem sendo submetida a extenso trabalho de revisão, publicado tanto em formato de artigos, quanto de capítulos de livros. Carr, Fibiger e Phillips (1989), Carboni e Vacca (2003), Carlezon (2003), Prus *et al.* (2009), Swerdlow *et al.* (1990) e van der Kooy (1987) forneceram revisões introdutórias e gerais no MCL, sendo que Carr *et al.* (1989) e Swerdlow *et al.* (1990) apresentaram excelentes discussões de pontos sensíveis na literatura que continuam atuais. Phillips e Fibiger (1987) e Hoffman (1989) revisaram o uso do modelo na identificação de substratos encefálicos relevantes ao condicionamento induzido por opioides e psicoestimulantes. Bardo, Rowlett e Harris (1995) realizaram meta-análise do MCL com essas drogas e Lu, Shepard, Hall e Shaham (2003) revisaram os efeitos do estresse sobre o condicionamento ao local induzido com esses compostos. Schechter e Calganetti (1993; 1998) publicaram minuciosas indexações da literatura de MCL, enquanto Tzschentke (1998; 2007) apresentou extensas discussões compreensivas de resultados obtidos tanto com fármacos, quanto com eventos não farmacológicos e Aguilar, Rodríguez-Arias e Miñarro (2009) discutiram dados de reinstalação de comportamento. Bardo e Bevins (2000) forneceram análise das vantagens e desvantagens do MCL enquanto medida de reforçamento por drogas, além de terem discutido aspectos sensíveis no embasamento teórico do modelo, e Risinger, Cunningham, Bevins e Holloway (2002) descreveram trabalhos com MCL envolvendo etanol desenvolvidos em seus respectivos laboratórios<sup>2</sup>.

Como pode ser deduzido desta rápida listagem, muitas dessas revisões discutem pontos importantes das literaturas geral e específicas de MCL e suas leituras são indispensáveis à compreensão do modelo (em especial, Bardo & Bevins, 2000; Bardo *et al.*, 1995; Carr *et al.*, 1989; Swerdlow *et al.*, 1990; Tzschentke, 1998; 2007). Todavia, até onde se saiba, nenhuma revisão metodológica ampla e detalhada do MCL, geral ou específica, foi realizada ou sequer proposta em 60 anos de uso do MCL e mais de 40 anos de uso especializado no estudo do etanol

---

<sup>2</sup> A elencação exaustiva de revisões já publicadas para MCL (ou relacionadas a este modelo) foge aos propósitos deste capítulo. O leitor é referido às listas fornecidas por Schechter e Calganetti (1993; 1998) e por Tzschentke (1998; 2007).

em ratos<sup>3</sup>, o qual é o tema deste trabalho. Tal falta é surpreendente, dado o estado ainda controverso da literatura de MCL com etanol em ratos frente às literaturas de MCL com drogas psicoestimulantes e opioidérgicas em ratos (Bardo *et al.*, 1995; Tzschentke, 1998; 2007).

De fato, se repetirmos a comparação descritiva realizada na apresentação deste trabalho e selecionarmos 11 artigos publicados na década de 2000, o mesmo cenário de diversidade de resultados se apresenta: apenas 3 trabalhos relataram estabelecimento de preferência condicionada sem a necessidade de exposição dos animais ao etanol dias antes do condicionamento; 1 reportou preferência condicionada quando ocorreu exposição ao etanol dias antes do condicionamento e 2 relataram aversão condicionada após pré-exposição; 6 relataram ausência de condicionamento e 3 reportaram aversão condicionada como resultado de experimento sem pré-exposição (Becker, Schmitz, & Grecksch, 2006; Bussy & Riley, 2002; Bussy & Riley, 2004; Fidler *et al.*, 2004; Haleem, Hasnat, Shireen, Khan, & Haleem, 2005; Kotłinska, Biała, Rafalski, Bochenski, & Danysz, 2004; Martijena, Lacerra, Bustus, & Molina, 2001; Melis Enrico, Peana, & Diana, 2007; Morse, Schulties, Holloway, & Koob, 2000; Sable, White, & Steinpreis, 2004; Zhu, Bie, & Pan, 2007).

Igualmente, se tal diversidade de resultados é comum na literatura de MCL com etanol em ratos, a diversidade metodológica é desconcertante. A leitura da seção “Materiais e Métodos” dos artigos publicados por diferentes grupos (Cunningham, 1981; Morse *et al.*, 2000; Quertemont, Goffaux, Vlamincq, Wolf, & De Witte, 1998) ou até pelo mesmo grupo (Cunningham, 1981; Cunningham & Niehus 1993) expõe que as metodologias implementadas nas pesquisas podem ser ainda mais variadas que os próprios resultados reportados. Dessa forma, não seria despropósito afirmar que o atual conjunto de dados obtidos no MCL se encontra em situação similar àquela identificada por Walsh e Cummings (1976) na literatura do modelo de campo aberto, quando analisando resultados em relação aos métodos empregados: “(...) [a]paratos, técnicas, sujeitos, parâmetros, análises e interpretações se diversificaram de maneira descomunal, mas, na literatura, generalizações arrebatadoras e

---

<sup>3</sup> Van der Kooy (1987) argumentou que a “(...) história do método de condicionamento ao local é a [própria] história dos paradigmas de condicionamento animal e pode ser vista [como surgindo] a partir do final dos anos 1800 com Thorndike, que foi o primeiro [pesquisador] a estabelecer paradigmas formais de aprendizagem para os animais em laboratório” (van der Kooy, 1987, p. 230, tradução livre). Ainda assim, a maioria dos pesquisadores identifica em Beach (1957) o primeiro uso de procedimentos de MCL, mesmo que o paradigma de condicionamento por ele utilizado seja operante/instrumental (Bozarth, 1987; Bardo & Bevins, 2000). Na atualidade, os procedimentos adotados na maioria da literatura de MCL derivam daqueles implementados por Rossi e Reid (1976) e, portanto, fazem uso de condicionamento clássico (Bardo & Bevins, 2000). Nesse ponto, é interessante notar que Black *et al.* (1973) é o primeiro estudo publicado de MCL com etanol em ratos e segue o paradigma de condicionamento clássico 3 anos antes de Rossi e Reid (1976).



interpretações conflitantes continuam a ser feitas com base em estudos univariados” (Walsh & Cummings, 1976, p. 482, tradução livre).

Assim, este capítulo detalha as variáveis envolvidas no emprego do MCL para o estudo das propriedades motivacionais do etanol em ratos. Especificamente, para além das fontes comuns de erros e de variabilidade experimental (erros, vieses e variâncias metodológicas: Podsakoff, MacKenzie, Lee, & Podsakoff, 2003), a diversidade de resultados experimentais presentes na literatura é apreciada a partir da avaliação da diversidade de metodologias que produziram esses resultados (Reich, Green, Brock, & Tetlock, 2007; Robbins, 1977). Esse método é utilizado de forma que se possa avaliar as implicações (a) da alteração assistemática de variáveis paramétricas e não-paramétricas presente na literatura, (b) das relações destas modificações nas variáveis e nos métodos com os resultados encontrados e (c) da confiabilidade da livre comparação de resultados entre si, mesmo quando essa comparação ocorre em meta-análise (ver, por exemplo, Bardo *et al.*, 1995).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 BUSCA, AQUISIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ARTIGOS E DE EXPERIMENTOS**

Conforme recomendado por Garg, Hackam e Tonelli (2008) e por Edwards, Clarke, DiGuseppi, Pratap, Roberts e Wentz (2002), a estratégia de busca por artigos foi diversificada e todos os procedimentos de busca, identificação, aquisição, classificação e seleção foram realizados independentemente por 2 revisores. Durante os procedimentos de busca descritos a seguir, o critério de aquisição foi de que o artigo relatasse pesquisa experimental em condicionamento ao local induzido por administração de etanol em ratos. Em primeiro, procurou-se por artigos na base eletrônica da MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) por meio da combinação do termo “*ethanol*” com as expressões “*place conditioning in rats*”, “*place preference in rats*” e “*place aversion in rats*”, sem restrições de língua. O período compreendido nesta busca foi de janeiro de 1970 a janeiro de 2017. Este procedimento resultou em 371 entradas nas quais 68 artigos foram identificados e adquiridos.

Como segundo procedimento de busca, as referências de MCL com etanol em ratos fornecidas na literatura de indexação e de revisão compreensiva do modelo foram utilizadas na identificação de outros artigos que por ventura não houvessem sido encontrados no primeiro procedimento e as referências foram procuradas no Google Scholar (<http://scholar.google.com.br/>) e nos sítios de indexação, busca e editoração científicas da

American Psychological Association (<http://www.apa.org/pubs/journals/index.aspx>), Elsevier (<http://www.sciencedirect.com/>), Scielo (<http://www.scielo.org/php/index.php>), Springer (<http://link.springer.com/>) e Wiley (<http://onlinelibrary.wiley.com/>). No caso do Google Scholar e do Scielo, os artigos foram procurados por título próprio, e no caso dos demais sítios, por título, número e paginação do periódico. Dezenove artigos foram identificados e adquiridos.

No terceiro procedimento de busca, as referências fornecidas nos relatos experimentais adquiridos no primeiro e no segundo procedimento também foram utilizadas na identificação de outros artigos e a busca eletrônica foi realizada da mesma forma que no segundo procedimento. Vinte e um artigos foram identificados e 16 foram adquiridos desta forma. Por último, os 5 artigos não encontrados em bases eletrônicas foram solicitados por e-mail aos seus respectivos autores ou aos editores dos periódicos nos quais foram publicados e 4 artigos foram adquiridos.

Dos 107 artigos adquiridos, as sessões de materiais e métodos, resultados, discussão e conclusão foram lidas integralmente e, a partir da leitura, os artigos foram avaliados com relação aos seguintes critérios de exclusão entre fatores (fator = artigo) previamente estabelecidos: emprego de outros modelos antes do MCL ou emprego de modelos de maneira concomitante ao MCL no mesmo desenho experimental; amostras compostas somente por fêmeas, por machos e fêmeas indiscriminadamente ou de sexo não relatado; estudo dos efeitos do etanol sobre condicionamento ao local induzido por outras drogas ou substâncias; via de administração central para administração do etanol no condicionamento; artigos no estilo reportagem breve (*brief reports*) nos quais não são reportados os procedimentos de condicionamento e o aparato de MCL utilizados; relato referente a condicionamento ao local de segunda ordem; condicionamento ao local induzido por etanol segundo condicionamento instrumental/consumo voluntário de etanol no MCL; administração de etanol para o teste pós-condicionamento. Além disso, 1 artigo foi excluído por conta de os revisores não conseguirem determinar se os animais utilizados no MCL foram submetidos anteriormente a outros procedimentos experimentais descritos no artigo.

Após a aplicação dos procedimentos de exclusão, os 62 artigos remanescentes foram classificados em 4 categorias dependendo das relações etanol-outras-drogas investigadas: a) *Artigos Somente Etanol* (ASE), nos quais somente condicionamento ao local induzido por etanol é reportado; b) *Artigos Comparativos Etanol* (ACE), nos quais condicionamento ao local induzido por etanol e por outras drogas são reportados separadamente; c) *Artigos Sham Etanol* (AShE), nos quais se verifica efeitos da administração de outras drogas e substâncias sobre o condicionamento induzido por etanol; d) *Artigos Misturados Etanol* (AME), que apresentam

características de *b* e *c*. Os revisores divergiram nas classificações de 6 artigos nas categorias ACE, AShE e AME e foi acordada a criação de uma quinta categoria para os mesmos: *Artigos Dúbios Etanol* (ADE), de classificação dúbia. Simultaneamente, os artigos foram subclassificados em (a) pesquisas nas quais não há grupos expostos ao etanol antes do MCL e (b) pesquisas nas quais alguns ou todos os grupos foram expostos ao etanol antes do condicionamento ao local. Essa classificação foi efetuada a fim de possibilitar a discriminação de protocolos de pré-exposição ao etanol (antes da primeira sessão da primeira fase do protocolo de MCL) e de exposição continuada ao etanol (durante qualquer uma das fases do protocolo de MCL) em relação aos protocolos de pré-exposição e de exposição continuada *sham*<sup>4</sup> de etanol e *sham* de outras drogas. A classificação pode ser vista na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1.**

Artigos organizados de acordo com as relações etanol-outras-drogas estudadas no condicionamento ao local induzido por etanol.

Categoria	Artigos segundo protocolos com e sem fase de pré-exposição ao etanol
ASE	<b>Sem pré-exposição ao etanol:</b> Bormann e Cunningham (1998); Bozarth (1990); Cunningham (1981); Cunningham e Niehus (1993); Cunningham, Niehus e Noble (1993); Gauvin, Briscoe, Goulden e Holloway (1994); Gauvin, Briscoe, Baird, Vallett e Holloway (1997); López e Cantora (2010); Morales, Varlinskaya e Spear (2012); Morse <i>et al.</i> (2000); Schechter (1992); Van der Kooy, O'Shaughnessy, Mucha e Kalant (1983); Yu, Wang, Zhao, Song e Wang (2016). <b>Com pré-exposição ao etanol:</b> Bieńkowski, Kuca e Kostowski (1995); Ciccocioppo, Panocka, Froidi, Quitadamo e Massi (1999); Fidler <i>et al.</i> (2004); Reid, Hunter, Beaman e Hubbell (1985).
ACE	<b>Sem pré-exposição ao etanol:</b> Asin, Wirtshafter e Tabakoff (1985); Busse e Riley (2002); Busse, Lawrence e Riley (2004); Haleem <i>et al.</i> (2005); Patkina e Zvartau (1998); Quertemont e De Witte (2001); Quertemont, Goffaux, Vlamincq, Wolf e De Witte (1998); Stewart e Grupp (1981); Stewart e Grupp (1985). <b>Com pré-exposição ao etanol:</b> Alaux-Cantin, Warnault, Legastelois, Botia, Pierrefiche, Vilpoux e Naassila (2013); Barbier, Pierrefiche, Vaudry, Vaudry, Daoust e Naassila (2008); Bieńkowski, Kuca, Piasecki e Kostowski (1996); Busse, Lawrence e Riley (2005).
AShE	<b>Sem pré-exposição ao etanol:</b> Al Ameri, Al Mansouri, Al Maamari e Bahi (2014); Bagrov, Dmitrieva, Manusova, Zvartau, Patkina e Bagrov (1999); Bahi (2013); Bahi e Dreyer (2013); Bahi e Dreyer (2014); Bedingfield, King e Holloway (1999); Bieńkowski, Iwinska, Piasecki e Kostowski (1997); Bieńkowski, Kuca, Piasecki e Kostowski (1997); Bormann e Cunningham (1997); Marglin, MacKechnie, Mattie, Hui e Reid (1988); Martijena <i>et al.</i> (2001). <b>Com pré-exposição ao etanol:</b> Ciccocioppo, Panocka, Polidori, Regoli e Massi (1999); Gawel, Labuz, Gibula-Bruzda, Jenda, Marszalek-Grabska, Silberring e Kotlinska (2016); Pascual <i>et al.</i> (2012).
AME	<b>Sem pré-exposição ao etanol:</b> Becker <i>et al.</i> (2006); Bie, Zhu e Pan (2009); Cole, Sumnall, O'Shea e Marsden (2003); Ise, Mori, Nagase e Suzuki (2013); Melis <i>et al.</i> (2007); Peana <i>et al.</i> (2008); Rezayof, Gheipour e Nazari-Serenjeh (2012); Zarrindast, Meshkani, Rezayof, Beigzadeh e Rostami (2010); Zhu <i>et al.</i> (2007); Zuo, Fu, Hopf, Xie, Krnjević, Li e Ye (2017). <b>Com pré-exposição ao etanol:</b> Kotlinska, Bochenski e Danysz (2011); Sable <i>et al.</i> (2004).
ADE	<b>Sem pré-exposição ao etanol:</b> Biała e Langwiński (1996a); Biała e Langwiński (1996b). <b>Com pré-exposição ao etanol:</b> Biała e Kotlinska (1999); Gibula-Bruzda, Marzalek-Grabska, Gawel, Witkowska, Izdebski e Kotlinska (2015); Kotlinska <i>et al.</i> (2004); Kotlinska, Pachuta, Dylag e Silberring (2007).

**Nota:** ASE, Artigos Somente Etanol; ACE, Artigos Comparativo Etanol; AShE, Artigos *Sham* Etanol; AME, Artigos Misturados Etanol; ADE, Artigos Dúbios Etanol.

Posteriormente à classificação, critérios de exclusão intra-fatores foram aplicados nos experimentos reportados, sendo que cada grupo experimental foi considerado um experimento

<sup>4</sup> Tratamentos *sham* são tratamentos falsos/controles realizados nos animais do grupo controle de forma que todos os animais no estudo passem pelos mesmos procedimentos e a única diferença entre os animais dos grupos controle e do grupo experimental seja a administração da droga em si.

diferente. Os seguintes critérios foram aplicados: exclusão de experimentos com condicionamento ao local induzido por etanol em outras espécies; exclusão de experimentos de condicionamento ao local induzido por outras drogas; exclusão de experimentos acerca dos efeitos de outras drogas sobre o condicionamento ao local induzido por etanol, exceto para os experimentos nos quais os animais foram *sham* tratados com outras drogas; exclusão de experimentos sobre efeitos do etanol no condicionamento ao local induzido por outras drogas; exclusão de experimentos de condicionamento ao local induzido por solução de etanol com outra(s) droga(s) ou com administração concomitante de substâncias com propriedades reforçadoras (e.g., comida) ou aversivas (e.g., solução de ácido clorídrico); exclusão de experimentos nos quais 2 ou mais animais foram colocados simultaneamente na câmara de condicionamento.

Outros critérios de exclusão intra-fatores aplicados foram: quando reportado mais de um procedimento de condicionamento ao local com etanol no mesmo grupo de animais, exclusão dos dados do segundo procedimento em diante, exceto quando os dados dos testes pós-condicionamento são reportados somente como uma média conjunta (nestes casos, os procedimentos foram considerados como sendo um só); quando reportado mais de um teste de condicionamento, exclusão de dados referentes ao segundo teste em diante, exceto quando os dados dos testes pós-condicionamento são reportados somente como uma média conjunta (nestes casos, os testes foram considerados como sendo um só); exclusão de experimentos nos quais o etanol foi administrado após a última sessão de condicionamento com um intervalo menor que 18 horas (h) antes da sessão de teste pós-condicionamento; exclusão de dados de reinstalação de comportamento; exclusão de dados de experimentos com outros modelos empregados após o MCL; exclusão de experimentos com outros modelos.

Adicionalmente, como artigos de diferentes categorias reportam mais de um experimento, os experimentos selecionados de um mesmo artigo analisado foram indexados alfanumericamente (E1, E2, E3, ..., En) de acordo com a ordem de apresentação dos mesmos no artigo. A indexação objetivou facilitar a identificação particular dos experimentos e de seus resultados. O total de artigos identificados, adquiridos e excluídos pode ser visto no Apêndice A deste trabalho.

## **2.2 EXTRAÇÃO DE DADOS**

### *2.2.1 Protocolo de extração de dados e dados extraídos*

Diferentemente da recomendação de Garg *et al.* (2008) e de Edwards *et al.* (2002), a extração de dados foi realizada somente pelo autor. Como tentativa de diminuir a alta

probabilidade de erros durante a extração, a mesma foi realizada segundo o seguinte protocolo. Em primeiro, 15 artigos foram selecionados aleatoriamente dos 62 e, a partir da leitura deles, foi estabelecida a definição das categorias de dados a serem extraídos. Em seguida, todos os artigos tiveram seus dados extraídos a partir dessa definição. Posteriormente, nova extração foi realizada para cada artigo a partir de nova leitura dos mesmos, segundo a definição anteriormente utilizada e na mesma ordem empregada na primeira extração. Nos casos em que houve discrepância entre as duas extrações, nova leitura do dado referente foi efetuada e a correção realizada/confirmada. Esse método não garante exclusão total de erros de extração, em especial dos erros advindos de interpretação textual. Ainda assim, o mesmo garante maior fidedignidade dos dados extraídos em relação aos dados reportados nos artigos.

Foram extraídos dados referentes a 3 categorias metodológicas gerais: (a) animal-modelo, (b) aparatos de MCL e (c) arranjos experimentais, de condicionamento e de teste. Os seguintes dados são componentes dessas categorias:

**a)** Para animal-modelo: Linhagem, idade no início do experimento com MCL, peso no início do experimento com MCL, tipo de alocação nas gaiolas-viveiro (individual, grupal), ciclo claro-escuro e horário do experimento.

**b)** Para aparatos de MCL: dimensões do aparato, dimensões das câmaras de condicionamento, número de câmaras, tipo de aparato (com ou sem viés), critério de escolha da câmara/estímulo pareado com a administração do etanol (câmara com menor tempo de permanência na linha de base, câmara com maior tempo de permanência na linha de base e contrabalanço do pareamento), e modalidades dos estímulos empregados ao condicionamento.

**c)** Para arranjos experimentais, de condicionamento e de teste: vias de administração do etanol e de tratamentos *sham* utilizadas na fase de pré-exposição, vias de administração do etanol e de tratamentos *sham* utilizadas na fase de exposição continuada, via de administração do etanol na fase de condicionamento, concentrações/volumes de etanol utilizadas nas fases de pré-exposição, exposição continuada e de condicionamento, doses de etanol utilizadas nas fases de pré-exposição, exposição continuada e de condicionamento, número de sessões de pré-exposição, de exposição continuada, de habituação ao aparato e aos estímulos, de linha de base (teste pré-condicionamento) e de condicionamento, duração das sessões de pré-exposição, de exposição continuada, de habituação ao aparato e aos estímulos, de linha de base, de condicionamento e de teste (pós-condicionamento), intervalos entre as sessões de pré-exposição, de exposição continuada, de habituação ao aparato e aos estímulos, de linha de base e de condicionamento, intervalo entre as sessões de exposição continuada e de habituação, entre as sessões de exposição continuada e de linha de base, entre as sessões de

exposição continuada e de condicionamento, e entre as sessões de exposição continuada e de teste, intervalos interfásicos pré-exposição–habituação, pré-exposição–linha de base, pré-exposição–condicionamento, habituação–linha de base, habituação–condicionamento, linha de base–condicionamento, e condicionamento–teste, ordem das sessões de condicionamento, intervalos entre as apresentações dos estímulos incondicional (US) e condicional (CS) nas sessões de condicionamento (intervalo entre estímulos).

Além dos dados acima referidos, a citação do artigo (nomes dos autores e data de publicação) e os resultados reportados (preferência condicionada ao local, aversão condicionada ao local e não significativo) também foram extraídos.

### 2.2.2 Definições gerais e de dados extraídos

Cabem neste momento algumas definições acerca das características gerais do MCL e de protocolos associados de forma que o leitor possa entender os dados extraídos e suas delimitações. Em primeiro, os aparatos de MCL são caracterizados e a seguir são definidos dados alusivos extraídos. Em segundo, é apresentada a ideia geral do protocolo de MCL e, em sequência, a definição de dados referentes extraídos.

Corriqueiramente, os aparatos de MCL são compostos por 2 ou 3 câmaras que podem ser isoladas umas das outras por portas em guilhotina, sendo que, nos aparatos de 3 câmaras, a segunda câmara dá acesso às câmaras distas e é de dimensões menores. Em cada uma dessas câmaras, estão dispostas diferentes combinações de estímulos de uma ou mais modalidades (luminosa, mecânica e/ou química) tanto nos pisos, quanto nas paredes. Durante a fase de condicionamento (definida mais abaixo), as combinações das câmaras distais são diferencialmente associadas com os efeitos da administração da solução de etanol e do veículo dessa solução.

Além disso, de acordo com o tempo de permanência dos animais nas câmaras distais durante a fase de linha de base (definida mais abaixo), os aparatos são classificados em (a) *aparato com viés*, caso o animal permaneça relativamente mais tempo numa câmara distal que em outra, ou em (b) *aparato sem viés*, caso os tempos de permanência sejam similares. Essa classificação está relacionada com o critério de escolha da câmara distal com a qual a administração de etanol será pareada na fase de condicionamento. Caso o aparato apresente viés e o experimentador escolha a câmara com menor tempo ou a câmara com maior tempo, o protocolo de condicionamento é dito com viés; caso, independentemente de o aparato ser *com viés* ou *sem viés*, o experimentador escolha fazer contrabalanço do pareamento, o protocolo de

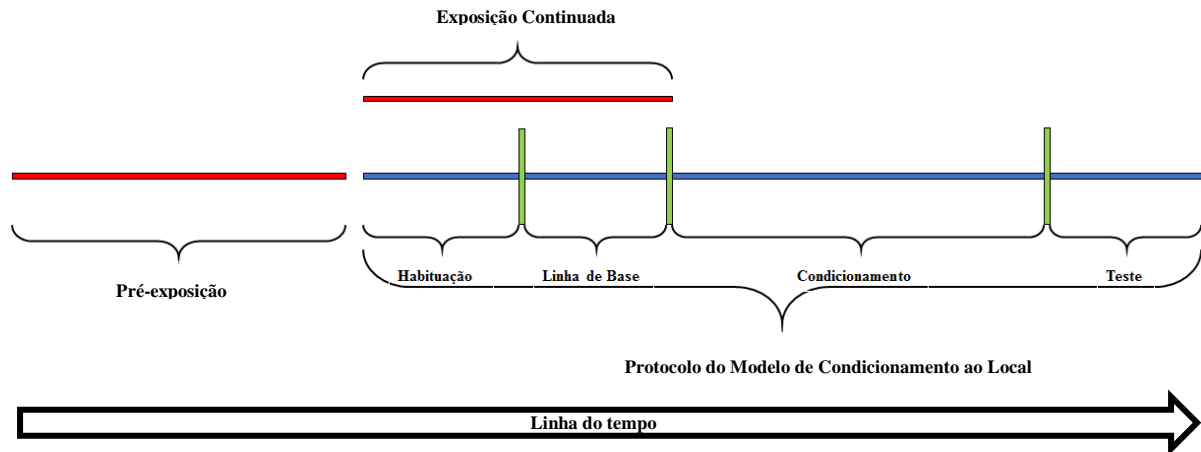
condicionamento é dito sem viés (o contrabalanço de câmaras é definido mais abaixo, no parágrafo referente à fase de condicionamento).

A partir disso, dados referentes às dimensões do aparato e das câmaras de condicionamento foram extraídos, bem como dados referentes ao número de câmaras do aparato e acerca das modalidades dos estímulos empregados ao condicionamento. O *critério de escolha da câmara* a ser pareada com etanol também foi extraído de forma a se analisar qual tipo de protocolo de condicionamento está sendo empregado. Além disso, a classificação de aparatos como *com viés* e *sem viés* empregada neste trabalho é majoritariamente categórica e está intimamente relacionada com o *critério de escolha da câmara* com a qual o etanol foi pareado. Quando os experimentadores aplicaram o critério de escolha de menor ou de maior tempo de permanência na linha de base para escolher a câmara, o aparato foi definido como *com viés*. Quando o critério foi contrabalanço de pareamento de câmara, o aparato foi definido como *sem viés*. Isso ocorreu porque raras vezes os experimentadores relataram o tempo de permanência dos animais em cada uma das câmaras distais dos aparatos durante a linha de base, o que impossibilitou que a classificação de *tipo de aparato* fosse integralmente quantitativa.

Com respeito aos protocolos de MCL, esses são habitualmente definidos como compostos de 2 (condicionamento e teste) a 4 fases (habituação, linha de base, condicionamento e teste), sendo que protocolos de 3 fases podem ser formados (a) por fases de habituação, condicionamento e teste ou (b) por fases de linha de base, condicionamento e teste. Tradicionalmente, cada fase é temporalmente espaçada (não se sobrepõe a outra) e sequencial, uma em relação a outra, em ordem definida, sendo que cada fase pode ser composta por uma ou mais sessões. Os intervalos entre sessões de uma mesma fase são chamados de *intervalos entre sessões* e os intervalos entre diferentes fases são chamados *intervalos interfásicos*. A fase de pré-exposição, quando presente, está anteposta à primeira fase do protocolo de MCL empregado e a fase de exposição continuada, quando presente, está sobreposta às mesmas. A Figura 1.1 ilustra essas relações. A seguir cada uma dessas fases é definida.

Como implica a denominação, a fase de habituação tem propósito de habituar o animal ao aparato de forma que o responder do mesmo alcance níveis estáveis antes do condicionamento ser efetuado. Durante a mesma, o animal é exposto ao aparato, com livre acesso a todos os estímulos e/ou câmaras que o compõem, sendo que essas sessões de livre acesso podem variar em número e em duração. Por sua vez, a fase de linha de base é aquela na qual o experimentador realiza o registro do comportamento basal do animal com livre acesso ao aparato. O parâmetro comportamental registrado é o tempo de permanência do animal nas diferentes câmaras do aparato. Quando presente no protocolo, essa fase geralmente apresenta

apenas uma sessão, sendo que diferentes experimentos de MCL empregam diferentes durações nas sessões. Na prática, sessões de fases de habituação e de linha de base raramente diferem entre si no que concerne o processo comportamental do animal. Quando isso ocorre, essas fases podem ser consideradas como compondo uma única fase, a fase de habituação.



**Figura 1.1.** Esquema temporal do protocolo de MCL e de protocolos associados.

Barras verticais discriminam intervalos interfásicos. Sessões de uma mesma fase e os correspondentes intervalos entre sessões não são indicados.

A fase de condicionamento faz referência aos procedimentos de condicionamento em si. Nesta, a administração do estímulo incondicional (i.e., a solução de etanol) é pareada com a apresentação do estímulo condicional (i.e., uma das câmaras distais do aparato). Geralmente, numa dada sessão de condicionamento, o etanol é administrado e o animal é confinado numa das câmaras do aparato. Na sessão seguinte, o veículo da solução é administrado e o animal é confinado em outra das câmaras distais do aparato. A duração desses confinamentos constitui a duração das sessões de condicionamento, sendo que a ordem das sessões de condicionamento pode ser droga-veículo, veículo-droga ou contrabalanceadas dentro do mesmo grupo de animais (i.e., tanto droga-veículo quanto veículo-droga). Além disso, o pareamento diferencial do etanol e de seu veículo com as câmaras distais também pode ser contrabalanceado dentro do mesmo grupo: para dados animais do grupo, o etanol é pareado com a câmara  $x$  e o veículo com a câmara  $y$ ; para outros animais do mesmo grupo, o etanol é pareado com a câmara  $y$  e o seu veículo com a câmara  $x$ .

A fase de teste diz respeito ao exame dos efeitos do condicionamento sobre o tempo de permanência do animal nas câmaras com as quais as administrações da droga e de seu veículo foram diferencialmente pareadas durante o condicionamento. Nela, o animal volta a ter livre acesso a todas as câmaras que compõem o aparato e se registra o tempo de permanência em



cada uma delas. Tradicionalmente, a duração da sessão de teste é a mesma da sessão de linha de base.

Por sua vez, nesse trabalho, a fase de pré-exposição diz respeito a protocolos de administração de etanol ou de veículos realizados antes das fases componentes do MCL. Ou seja, esta fase faz referência a (a) procedimentos de intoxicação com etanol antes do emprego do MCL e (b) a procedimentos controle (*sham*) da intoxicação prévia, ambos no mesmo desenho experimental. Já a fase de exposição continuada diz respeito a protocolos de administração de etanol ou de veículos sobrepostos às fases dos protocolos de MCL. Nessa fase, as administrações de etanol e de veículos não servem ao condicionamento em si (i.e., não são pareadas com o confinamento em dadas câmaras do aparato), mas servem de (a) procedimento de intoxicação adicional e de (b) procedimento controle (*sham*) com respeito à (1) intoxicação adicional e aos (2) procedimentos de administração do etanol na fase de condicionamento. No caso de *a* e de *b1*, as sessões de exposição continuada sucedem as sessões das fases de MCL sobre as quais se encontra. No caso de *b2*, o veículo da solução de etanol é administrado antes das sessões das fases de habituação, de linha de base e de teste de forma que, ao longo de todo o protocolo de MCL, o animal receba o mesmo procedimento geral de administração.

Dessa maneira, dados de intervalos entre as sessões de uma mesma fase e entre as fases do protocolo de MCL fazem referência a um evento (sessão ou fase) diretamente precedente a outro (sessão ou fase, respectivamente) e, em termos de horas, tem valores nulos (zero) ou positivos. Por exemplo, o intervalo entre as fases de habituação e de condicionamento diz respeito ao lapso temporal entre o término da última sessão da fase de habituação que precede diretamente o início da primeira sessão da fase de condicionamento; caso exista fase de linha de base entre a fase de habituação e a fase de condicionamento, o intervalo entre habituação e condicionamento não é aplicável<sup>5</sup>. Esses critérios acerca das relações temporais entre as sessões e entre as fases do protocolo de MCL foram estendidos à fase de pré-exposição, visto que as relações temporais nela presentes são similares às encontradas no protocolo de MCL e a extensão facilita a análise dos dados referentes.

---

<sup>5</sup> Quertemont *et al.* (1998) e Quertemont e De Witte (2001) quebraram essa tradição ao dissociarem a apresentação do CS da apresentação da câmara de condicionamento. Nos experimentos relatados por esses pesquisadores, (a) cada sessão de habituação antecedeu diretamente cada sessão de condicionamento, (b) a linha de base (i.e., o tempo de permanência pós-condicionamento do animal na câmara em que o CS será apresentado) antecedeu imediatamente o teste e, portanto, (c) ocorreu após o condicionamento. Assim, para esses experimentos, o intervalo entre fases pode ser de minutos ou horas e é negativo o intervalo entre as fases de linha de base e de condicionamento.

Por outro lado, como a fase de exposição continuada (ao etanol e/ou a tratamentos *sham*) está sobreposta a fases componentes do protocolo de MCL e suas sessões podem anteceder ou suceder as sessões dessas fases, os dados dos intervalos entre a fase de exposição continuada e as fases do MCL são mais facilmente descritos em termos de minutos: raras vezes a sessão de exposição continuada antecede ou sucede a sessão de outra fase por período maior que 1 h. A partir disso, foi decidido que esses intervalos seriam melhor expressos como intervalos entre sessões de exposição continuada e sessões das fases do MCL, variando de valores negativos (quando sucede) a zero (imediatamente antes ou depois) e positivos (quando antecede) em termos de minutos.

No caso do dado referente ao intervalo entre estímulos, este intervalo pode ser (em termos de minutos) positivo, negativo ou de zero, a depender da ordem e do espaçamento temporal em que os estímulos são apresentados: se o estímulo condicional é apresentado um ou mais minutos antes do estímulo incondicional, o intervalo é positivo; se apresentado um ou mais minutos depois, o intervalo é negativo; se apresentado imediatamente antes, simultaneamente ou imediatamente depois, o intervalo foi considerado de valor zero. Outrossim, como a *via de administração do etanol* determina diferentes farmacocinéticas para este fármaco e a *concentração* e o *volume da solução* administrada podem interferir com o bem-estar animal, esses dados também foram extraídos. As *doses de etanol* administradas também foram extraídas devido aos diferentes efeitos farmacodinâmicos que essas apresentam.

Ademais, no que se refere à definição da fase de pré-exposição, a administração de anestésicos para execução de procedimentos cirúrgicos (para implantação de cânulas no encéfalo, intubações gástrica, intraperitoneal e intravenosa etc.) não foi considerada como componente dessa fase. Ainda que as administrações desses farmacos nesses casos possam ser consideradas sessões de pré-exposição, tal conceituação tornaria inviável a utilização de muitos experimentos e mesmo de muitos artigos nesta revisão, visto que estaríamos estudando os efeitos de outras drogas sobre o MCL com etanol em ratos (um dos critérios de exclusão intra-fatores aplicado no procedimento de seleção de experimentos).

### **2.3 ORGANIZAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS EXTRAÍDOS**

Os dados extraídos foram organizados em tabelas e figuras descritas e examinadas dentro de subseções da seção “Resultados e discussão”, correspondentes às 3 categorias metodológicas gerais. Em cada tabela e figura, os artigos e os experimentos reportados foram agrupados de acordo com suas similaridades metodológicas. No caso dos dados referentes às dimensões das câmaras de condicionamento, esses foram utilizados no cálculo da área dessas

câmaras e no cálculo de razão entre as dimensões de comprimento e largura (comprimento dividido por largura) de forma a fornecer índice de formato das câmaras de condicionamento.

As variações assistemáticas e suas possíveis implicações aos resultados reportados foram discutidas de acordo com dados advindos de outras literaturas experimentais pertinentes nas quais as variáveis sob análise já foram estudadas de forma comparada. Essa literatura é composta por estudos experimentais em ratos das mesmas linhagens heterogênicas utilizadas com maior frequência na literatura de MCL revisada. Exceção nesse ponto constitui a literatura geral de condicionamento clássico, na qual coelhos, ratos, ovelhas, cabras e cães são os animais utilizados. Estudos teóricos e de revisão também foram utilizados na discussão, mas somente nos casos em que estudos experimentais relevantes não foram encontrados e tais estudos pudessem ajudar na discussão e na identificação de variáveis possivelmente envolvidas na obtenção dos resultados reportados. A análise estatística foi realizada por teste exato de Fisher (bicaudal) e, quando apropriado, pelo teste Qui-quadrado (bicaudal) de forma a avaliar a distribuição de frequências de resultados reportados segundo cada fator analisado, com  $\alpha = 0,05$ .

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 ANIMAL-MODELO**

##### *3.1.1 Linhagens*

Ratos das linhagens albinas heterogênicas Wistar (W) e Sprague-Dawley (S-D) foram os sujeitos mais utilizados nos estudos revisados de MCL com etanol, com um total de 106 e 54 experimentos sem fase de pré-exposição ao etanol para cada linhagem, respectivamente. No caso de experimentos com pré-exposição ao etanol, foram reportados 46 experimentos para W e 12 para S-D. Menos frequente tem sido o uso da linhagem Holtzman (H), com relatos de apenas 18 experimentos, e das linhagens pigmentadas Lister (L) (4 experimentos) e Long-Evans (L-E) (2 experimentos), todos sem fase de pré-exposição ao etanol. No caso de linhagens isogênicas, a linhagem msP foi empregada em 17 experimentos, todos com fase de pré-exposição ao etanol. Animais das linhagens isogênicas Wistar (shoe), P e NP também foram empregados, mas somente 2 experimentos foram reportados para a primeira e 1 experimento para cada uma das últimas. Devido a essa grande diferença de número de experimentos por linhagem, a análise nessa seção se centra nas linhagens H, S-D, W e msP, em especial as 3 primeiras. A Tabela 1.2 resume esses dados.

**Tabela 1.2.**Experimentos e resultados reportados por linhagem de *Rattus norvegicus*

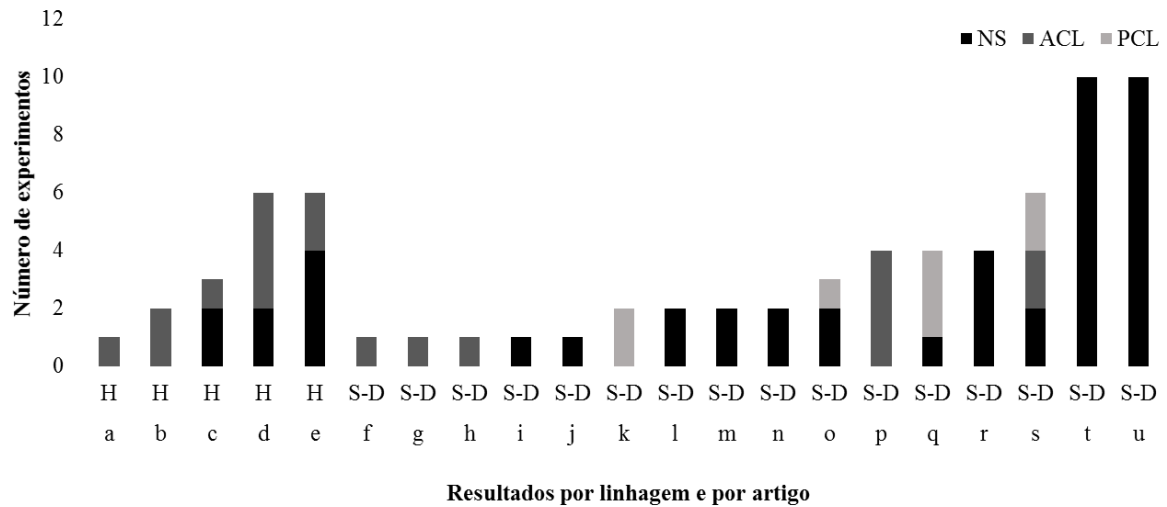
Linhagem	Nº PCL	Nº ACL	Nº NS	TOTAL	% PCL	% ACL	% NS
<b>Animais sem pré-exposição ao etanol</b>							
Holtzman	0	10	8	18	0,00	55,56	44,44
Lister	2	0	2	4	50,00	0,00	50,00
Long-Evans	1	0	1	2	50,00	0,00	50,00
P	0	1	0	1	0,00	100,00	0,00
NP	0	1	0	1	0,00	100,00	0,00
Sprague-Dawley	8	9	37	54	14,81	16,67	68,52
Wistar	29	18	59	106	27,36	16,98	55,66
Wistar (shoe)	0	1	1	2	0,00	50,00	50,00
Total	40	40	108	188	-	-	-
<b>Animais com pré-exposição ao etanol</b>							
Sprague-Dawley	2	5	5	12	16,67	41,67	41,67
Wistar	40	2	4	46	86,96	4,35	8,70
msP	6	0	11	17	35,29	0,00	64,71
Total	48	7	20	75	64,00	9,33	26,67

**Nota:** Nº, número de experimentos; %, porcentagem de experimentos; PCL, preferência condicionada ao local; ACL, aversão condicionada ao local; NS, resultado não significativo.

Curiosamente, a inspeção dos resultados dos experimentos em referência à linhagem empregada sugere que as linhagens W, S-D e H diferem em relação aos efeitos do condicionamento nos experimentos sem pré-exposição ao etanol. A inspeção também sugere que, no caso dos experimentos com pré-exposição ao etanol, as linhagens msP, S-D e W também diferem entre si. Quando animais da linhagem H foram usados, condicionamento bem-sucedido (i.e., que produziu aversão ou preferência condicionada) ocorreu em 56% dos experimentos, sendo que os animais desenvolveram somente aversão condicionada ao local (ACL). Por sua vez, os animais S-D apresentam o menor sucesso de condicionamento em experimentos sem pré-exposição, ocorrendo condicionamento em apenas 32% dos experimentos relatados, sendo 15% para preferência condicionada ao local (PCL) e 17% para ACL. Os animais W aparentam ter sucesso mais próximo aos dos animais da linhagem H, com 44% dos experimentos com condicionamento bem-sucedido. Todavia, diferentemente da linhagem H, o condicionamento efetuado em animais da linhagem W pode gerar tanto ACL quanto PCL, com 17% e 27% dos experimentos produzindo uma ou outra, respectivamente.

De forma a estabelecer critérios à análise estatística dessa distribuição de frequência, os dados foram reorganizados segundo artigo por linhagem. Tal organização permite (a) avaliar diretamente tendências temporais de condicionamento bem-sucedido na literatura, (b) avaliar indiretamente a uniformidade de metodologias empregadas pelo mesmo grupo de pesquisa para a mesma linhagem e para linhagens diferentes. Também permite (c) comparar os resultados advindos de diferentes grupos de pesquisa quando empregando animais da mesma linhagem. A Figura 1.2 apresenta tal organização para protocolos sem pré-exposição nas linhagens H e S-D

e a Figura 1.3 exibe a organização para a linhagem W.



**Figura 1.2.** Resultados de protocolos de condicionamento sem pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e as linhagens Holtzman e Sprague-Dawley de *Rattus norvegicus*.

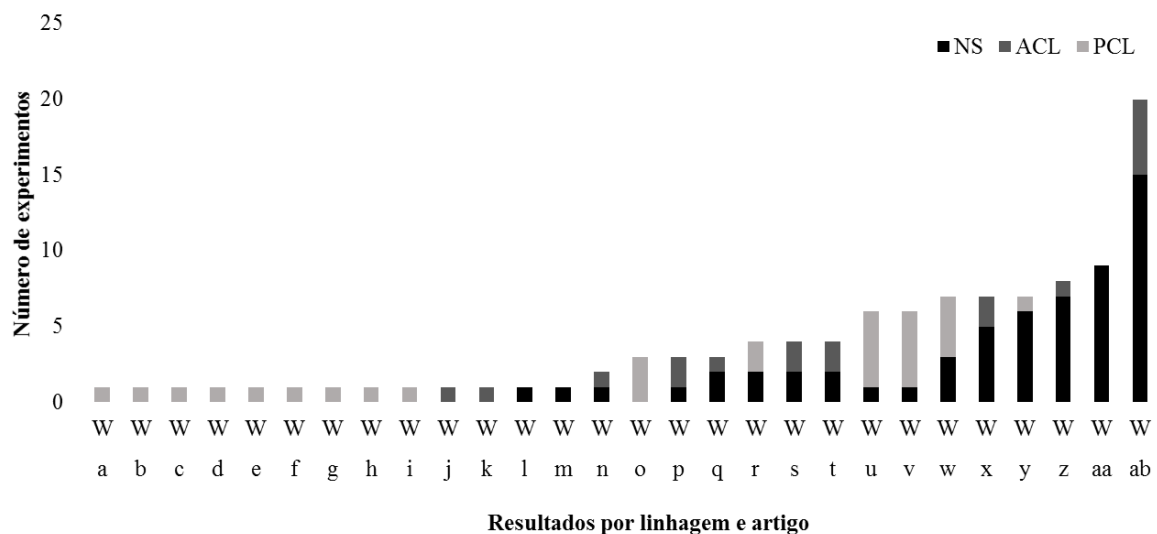
a, Cunningham *et al.* (1993); b, Cunningham (1981); c, Borman e Cunningham (1997); d, Cunningham e Niehus (1993); e, Borman e Cunningham (1998); f, Busse *et al.* (2005); g, Gauvin *et al.* (1994); h, Reid *et al.* (1985); i, Marglin *et al.* (1988); j, Yu *et al.* (2016); k, Alaux-Cantin *et al.* (2013); l, Bedingfield *et al.* (1999); m, Busse e Riley (2002); n, Busse *et al.* (2004); o, Barbier *et al.* (2008); p, Fidler *et al.* (2004); q, Morales *et al.* (2012); r, Gauvin *et al.* (1997); s, Zuo *et al.* (2017); t, Asin *et al.* (1985); u, Ise *et al.* (2013).

NS, não significativo; ACL, aversão condicionada ao local; PCL, preferência condicionada ao local; H, linhagem Holtzman; S-D, linhagem Sprague-Dawley.

Nota-se que os resultados para a linhagem H foram todos obtidos pelo grupo do pesquisador C. R. Cunningham. Também se nota que o grupo de Cunningham realizou 4 experimentos com a linhagem S-D (Fidler *et al.*, 2004). Em ambos os casos, os resultados dos experimentos foram de ACL. Assim, para além da possível inadequação da linhagem H à obtenção de PCL, isso pode significar que a metodologia empregada por esse grupo não é adequada *per se* ao condicionamento de PCL. Por outro lado, o uso de animais S-D pelos grupos de L. D. Reid, B. Tabakoff, F. A. Holloway, T. Suzuki, A. L. Riley, D. V. Gauvin e L. P. Spear ao longo dos últimos 30 anos, aliado ao pequeno sucesso de condicionamento obtido em animais nessa linhagem, sugere que animais S-D possuem sensibilidade diferente aos protocolos de condicionamento empregados. Assim, aparenta que as metodologias implementadas para outras linhagens não são inteiramente aplicáveis aos animais S-D. Entretanto percebe-se que a maioria dos resultados não significativos para animais S-D provém de Asin *et al.* (1985) e de Ise *et al.* (2013), o que pode ter enviesado a amostra.

No caso da linhagem W, dos 28 artigos analisados somente Gawel *et al.* (2016), Martijena *et al.* (2001) e Rezayof *et al.* (2012) não reportaram experimento com condicionamento bem-sucedido em protocolos sem pré-exposição ao etanol. Dos demais artigos, 15 relataram experimentos nos quais PCL foi estabelecida e 9 reportaram

estabelecimento de ACL. É importante notar nesse ponto que (a) artigos que relatam ACL para animais W não relatam PCL e vice-versa (diferentemente de animais S-D: Zuo *et al.*, 2017) e que (b) a obtenção de ACL está relacionada com falha de condicionamento em maior frequência que PCL. Com exceção de Bieńkowski *et al.* (1996), nos artigos que relatam PCL, essa ocorreu com frequência igual ou maior que resultados não significativos. Assim sendo, na linhagem W, protocolos que resultam em falhas de condicionamento aparentam ter maior probabilidade de produzirem ACL que PCL.



**Figura 1.3.** Resultados de protocolos de condicionamento sem pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e a linhagem Wistar de *Rattus norvegicus*.

**a**, Al Ameri *et al.* (2014); **b**, Bahi e Dreyer (2014); **c**, Bagrov *et al.* (1999); **d**, Patkina e Zvartau (1998); **e**, Bahi e Dreyer (2013); **f**, Haleem *et al.* (2005); **g**, López e Cantora (2010); **h**, Biała e Lagwiński (1996a); **i**, Melis *et al.* (2007); **j**, Bieńkowski, Iwinska *et al.* (1997); **k**, Bieńkowski, Kuca *et al.* (1997); **l**, Gawel *et al.* (2016); **m**, Martijena *et al.* (2001); **n**, Quertemont *et al.* (1998); **o**, Biała e Lagwiński (1996b); **p**, Morse *et al.* (2000); **q**, Stewart e Grupp (1981); **r**, Bahi (2013); **s**, Pascual *et al.* (2012); **t**, Quertemont e De Witte (2001); **u**, Bie *et al.* (2009); **v**, Zhu *et al.* (2007); **w**, Peana *et al.* (2008); **x**, Stewart e Grupp (1985); **y**, Bieńkowski *et al.* (1996); **z**, Zarrindast *et al.* (2010); **aa**, Rezayof *et al.* (2012); **ab**, Van der Kooy *et al.* (1983).

NS, não significativo; ACL, aversão condicionada ao local; PCL, preferência condicionada ao local; W, linhagem Wistar.

Também é interessante notar que as maiores frequências de falhas de condicionamento em animais W provêm somente de 4 artigos dos 28 que utilizaram essa linhagem, especificamente de experimentos realizados pelo grupo de M. R. Zarrindast e A. Rezayof e de estudos realizados na década de 1980, van der Kooy *et al.* (1983) e Stewart e Grupp (1985). Por um lado, isso sugere que as metodologias implementadas nesses 4 casos não são adequadas ao condicionamento nessa linhagem e, por outro, que há possibilidade de que os outros grupos de pesquisa estejam utilizando metodologias similares no emprego da linhagem W. De fato, 8 dos artigos que reportaram PCL utilizaram protocolos de condicionamento com longa duração (número de sessões de condicionamento  $\geq 12$ ) e esses artigos reproduziram maior frequência de PCL que os artigos que empregaram protocolos de curta duração.

A partir disso, as frequências de PCL, ACL e de resultados não significativos (NS) advindos de cada linhagem foram analisados das seguintes maneiras. Primeiro, as linhagens H, S-D e W foram comparadas sem restrições de dados. Em acordo com a análise até aqui realizada, houve diferença significativa entre as 3 linhagens no primeiro caso (teste exato de Fisher = 17,862,  $p < 0,001$ ). Em segundo, as linhagens foram comparadas aos pares: S-D vs. W (teste exato de Fisher = 3,413,  $p = 0,188$ ); S-D vs. H (teste exato de Fisher = 10,399,  $p = 0,005$ ); W vs. H (teste exato de Fisher = 14,584,  $p < 0,001$ ). Esses resultados indicam que, em protocolos sem pré-exposição ao etanol, a linhagem H difere das linhagens S-D e W (a) em relação à probabilidade de condicionamento bem-sucedido e (b) em relação a esse condicionamento resultar em PCL ou em ACL. Também indicam a possibilidade de não existir diferenças nas distribuições de resultados das linhagens W e S-D.

De forma a discernir possíveis efeitos de protocolos de curta duração (com número de sessões de condicionamento  $\leq 10$ ;  $C \leq 10$ ) e de longa duração (com número de sessões de condicionamento  $\geq 12$ ;  $C \geq 12$ ) sobre a distribuição de resultados, os dados das linhagens S-D e W foram estratificados em acordo. Essa estratificação está relacionada ao fato de que não houve reportagem de protocolos  $C \geq 12$  para a linhagem H, somente 2 artigos reportaram 5 protocolos  $C \geq 12$  com animais S-D (Fidler *et al.*, 2004; Marglin *et al.*, 1988), enquanto 8 artigos reportaram 26 protocolos  $C \geq 12$  com a linhagem W. Visto que esses protocolos parecem aumentar a probabilidade de condicionamento de PCL na linhagem W, é possível que diferenças entre as linhagens S-D e W estejam mascaradas por conta desses protocolos. Além disso, por motivos relacionados com as análises de dados realizadas nas seções 3.2 e 3.3, foram excluídos da análise os dados advindos de Bedingfield *et al.* (1999), Gauvin *et al.* (1994; 1997) e Reid *et al.* (1985) para animais S-D e de Morse *et al.*, (2000), Rezayof *et al.* (2012) e Zarrindast *et al.* (2010) para animais W.

Quando comparadas as 3 linhagens em protocolos  $C \leq 10$ , houve diferença significativa (teste exato de Fisher = 16,867,  $p = 0,001$ ). Como nenhum resultado de PCL foi relatado para a linhagem H, de forma a discernir se a diferença encontrada acima advém somente da distribuição desigual de PCL entre as linhagens H, S-D e W, os dados de PCL para as linhagens S-D e W foram excluídos e nova comparação foi realizada entre as 3 linhagens. Essa comparação também resultou em diferença (teste exato de Fisher = 12,685,  $p = 0,001$ ). Ainda nesse arranjo, as linhagens também foram comparadas aos pares: S-D vs. H ( $\chi = 13,240$ ,  $p = 0,001$ ); W vs. H ( $\chi = 4,155$ ,  $p = 0,051$ ); S-D vs. W ( $\chi = 4,720$ ,  $p = 0,033$ ). Como as linhagens S-D e W apresentaram diferença significativa, elas foram novamente comparadas excluindo-se alternadamente os dados de ACL ( $\chi = 0,142$ ,  $p = 0,784$ ) e NS ( $\chi = 4,300$ ,  $p = 0,066$ ). Esses

resultados confirmam os resultados anteriores e expõem que a linhagem H difere das linhagens S-D e W na probabilidade de obtenção de PCL em protocolos  $C \leq 10$ . Adicionalmente, esclarecem que (a) as linhagens H e S-D diferem na probabilidade de condicionamento de ACL e de NS, que (b) há pouca diferença entre as linhagens H e W na obtenção de ACL e de NS e que (c) as linhagens S-D e W diferem na produção de NS e, em especial, de ACL. O motivo dessas diferenças entre as linhagens em protocolos  $C \leq 10$  podem estar relacionados tanto com as linhagens *per se*, quanto com outras variáveis não identificadas nessa análise.

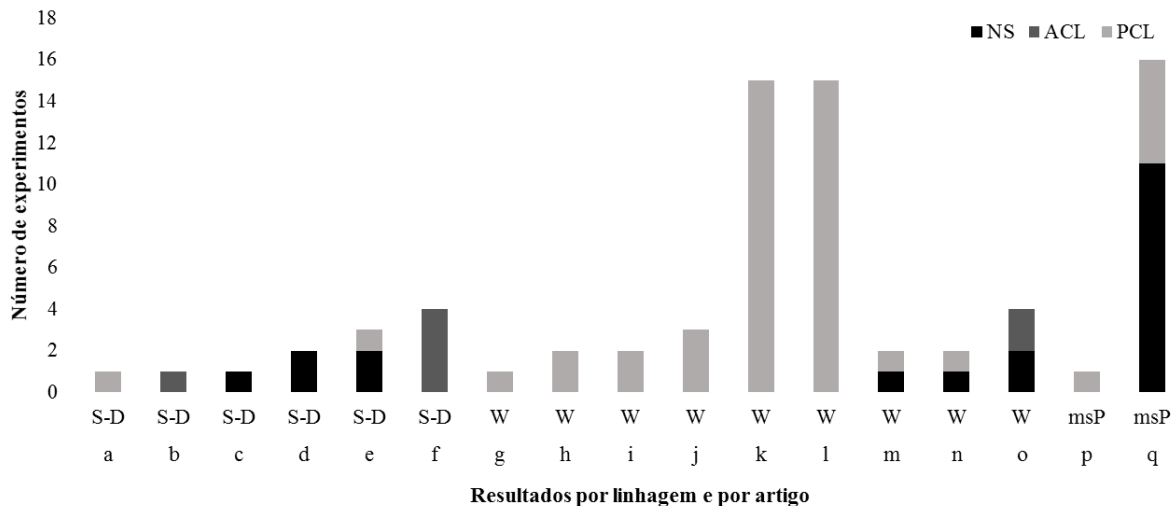
Por último, de forma a verificar a existência de diferença entre protocolos  $C \leq 10$  e  $C \geq 12$  nas linhagens S-D e W, outras duas comparações foram realizadas: (a) animais W em protocolos  $C \leq 10$  comparados com animais W em protocolos  $C \geq 12$ ; (b) animais S-D em protocolos  $C \leq 10$  comparados com animais W em protocolos  $C \geq 12$ . No primeiro caso, houve diferença significativa (teste exato de Fisher = 36,888,  $p < 0,001$ ). Esse resultado indica que protocolos  $C \geq 12$  aumentam a probabilidade de PCL e diminuem as probabilidades de ACL e de NS na linhagem W. Quando comparados protocolos  $C \leq 10$  nos animais S-D com os protocolos  $C \geq 12$  nos animais W, também houve diferença (teste exato de Fisher = 24,340,  $p < 0,001$ ). Esse resultado confirma que protocolos  $C \geq 12$  mascararam diferenças entre as linhagens S-D e W.

Tomados como um todo, esses resultados indicam que (a) a linhagem H difere na distribuição de frequência de resultados das linhagens S-D e W, sendo que o motivo da diferença de distribuição da linhagem H não pôde ser identificado nessa análise; (b) as linhagens S-D e W não diferem na distribuição de frequência de PCL em protocolos  $C \leq 10$ ; (c) as linhagens S-D e W diferem no que diz respeito à probabilidade de obtenção de NS e, em especial, de condicionamento ACL quando aplicados protocolos  $C \leq 10$ , sendo que os motivos dessa diferença não puderam ser identificados; (d) a aplicação de protocolos  $C \geq 12$  aumenta a probabilidade de condicionamento bem-sucedido (PCL) na linhagem W, o que pode aumentar as chances de erro de análise nas seções seguintes caso esse fator não seja isolado. Além disso, esses resultados não esclarecem covariáveis (sensibilidade diferenciada de cada linhagem ao etanol, dose de etanol administrada, volume da solução, via de administração etc.) inseridas nos protocolos de condicionamento.

No que diz respeito às linhagens utilizadas nos protocolos de MCL com pré-exposição, a Figura 1.4 apresenta os dados. Percebe-se que os protocolos de pré-exposição ao etanol parecem não afetar as chances de condicionamento bem-sucedido em ratos S-D em relação aos protocolos sem pré-exposição ao etanol. Também se nota que, mesmo utilizando a linhagem S-D e protocolo de pré-exposição ao etanol, o grupo de C. R. Cunningham (Fidler *et al.*, 2004)



novamente obteve ACL como resultado de seus experimentos. Dessa forma, essa nova ocorrência de resultados de ACL nos experimentos do grupo de Cunningham reforça que a metodologia empregada por esse grupo parece ser o principal fator na recorrência de ACL.



**Figura 1.4.** Resultados de protocolos de condicionamento com pré-exposição ao etanol, ordenados de acordo com o artigo e a linhagem de *Rattus norvegicus* empregada.

a, Reid *et al.* (1985); b, Busse *et al.* (2005); c, Sable *et al.* (2004); d, Alaux-Cantin *et al.* (2013); e, Barbier *et al.* (2008); f, Fidler *et al.* (2004); g, Kotlinska *et al.* (2007); h, Biala e Kotlinska (1999); i, Kotlinska *et al.* (2004); j, Kotlinska *et al.* (2011); k, Gibula-Bruzda *et al.* (2015); l, Gawel *et al.* (2016); m, Bieńkowski *et al.* (1995); n, Bieńkowski *et al.* (1996); o, Pascual *et al.* (2012); p, Ciccocioppo, Panocka, Polidori *et al.* (1999); q, Ciccocioppo, Panocka, Frolidi *et al.* (1999). NS, não significativo; ACL, aversão condicionada ao local; PCL, preferência condicionada ao local; msP, linhagem msP; S-D, linhagem Sprague-Dawley; W, linhagem Wistar.

No caso da linhagem W, percebe-se o estabelecimento de metodologia adequada à obtenção de PCL nos grupos de pesquisa relacionados ao grupo de P. Bieńkowski. Com exceção de Pascual *et al.*, (2012), todos os artigos que empregaram animais W fizeram uso da metodologia de pré-exposição desenvolvida por Bieńkowski *et al.* (1995) e refinada em Bieńkowski *et al.* (1996). Se por um lado isso indica a alta confiabilidade do método empregado na obtenção de PCL, por outro dificulta a avaliação da linhagem W *per se* e em comparação com outras linhagens por conta da baixa diversidade metodológica na literatura. De todo modo, a comparação dos resultados de animais W com os resultados de animais S-D sugere novamente que condicionamento ao local com etanol é mais facilmente obtido em animais W quando estes têm maior exposição ao etanol, tal qual é o caso nos protocolos longos de condicionamento.

Já para a linhagem isogênica msP, pelo menos duas interpretações são plausíveis. Quando se leva em consideração (a) o fato do estudo de Ciccocioppo, Panocka, Frolidi *et al.* (1999) ser de padronização de metodologia para o MCL com essa linhagem, (b) o fato dessa linhagem derivar da linhagem isogênica P e (c) os resultados (ACL e NS) obtidos por Schechter (1991) para linhagem P no modelo, os dados dispostos na Figura 3 podem indicar que animais

msP são menos propensos ao condicionamento bem-sucedido que animais S-D e W em protocolos com pré-exposição.

Todavia, quando se tem em conta que o estudo realizado por Ciccocioppo, Panocka, Frolidi *et al.* (1999) foi de padronização de metodologia e que o estudo Ciccocioppo, Panocka, Polidori *et al.* (1999) foi a única aplicação do método já padronizado, a primeira interpretação aparenta ser tendenciosa. Deste modo, na amostra revisada seria inadequada a comparação desses resultados (de padronização recente) com os resultados advindos da linhagem W (em sua maioria, com metodologia já padronizada) e da linhagem S-D (com metodologia não padronizada, mas com maior frequência de uso assistemático). Portanto, não foi aplicado teste estatístico em protocolos com pré-exposição com relação às linhagens utilizadas, visto que esse certamente resultaria significativo, mas pouco diria da confiabilidade da comparação.

Nesse ponto, visto que os resultados acima não esclarecem covariáveis nos protocolos de condicionamento, é interessante notar que estudos experimentais comparativos apontam diferenças entre as linhagens H, S-D e W em relação à distribuição, metabolização e farmacodinâmica do etanol. A maioria desses estudos se centrou na comparação de ratos W e S-D. Na avaliação do significado dos mesmos ao emprego das linhagens H, S-D e W no MCL com etanol, deve-se levar em conta que ratos S-D derivam de populações W e que ratos H derivam de populações S-D. Os estudos e suas possíveis implicações ao MCL são descritos a seguir.

De Antueno, Elliot e Horrobin (1994) relataram que a atividade de conversão de ácido graxos das dessaturases hepáticas  $\Delta$ -5 e  $\Delta$ -6 foi 50% menor em ratos da linhagem S-D que as atividades registradas em ratos L-E ou W. Como apontado por Kacew e Festing (1999), estas diferenças podem estar relacionadas com diferenças na razão gordura/peso corporal. Visto que a quantidade total de gordura corporal influencia de maneira inversamente proporcional a distribuição periférica de etanol, essa diferença entre as linhagens pode significar que, quando a mesma dose de etanol é administrada em ratos S-D e W da mesma idade e sexo, quantidades e/ou concentrações diferentes de etanol são distribuídas ao encéfalo em cada linhagem.

Além disso, outro fator que deve ser levado em consideração na comparação de resultados encontrados em diferentes linhagens é a indução de atividade do sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS, sigla em inglês). O MEOS é composto principalmente por membros da superfamília de isoenzimas Citocromo P450 (CYP). As principais isoenzimas induzidas por etanol em ratos são a CYP2E1 e a CYP1A2 (Lieber, 2004a;

2004b)<sup>6</sup>. No caso da isoenzima CYP2E1, a literatura revisada não indica modificações em sua indução devidas a polimorfismo (Hu, Hakkola, Oscarson, & Ingelman-Sundberg, 1999; Lieber, 2004a; 2004b; Umeno, Song, Kozak, Gelboin, & Gonzalez, 1988). Todavia Kishida *et al.* (2008) reportaram diferenças entre ratos S-D e W na expressão do mRNA CYP1A2 e no conteúdo total da isoenzima CYP1A2 nos hepatócitos centrolobulares. Em nível controle, a expressão e o conteúdo foram 3 vezes maiores em ratos W que em ratos S-D. Em nível induzido (quando o rato já tem histórico de administração de etanol), a expressão e o conteúdo foram 4 vezes maiores em ratos W quem em ratos S-D. Kishida *et al.* (2008) indicam ainda que aparenta haver correlação positiva entre a quantidade de mRNA CYP1A2 e a quantidade total encontrada da isoenzima, relação mRNA/isoenzima também indicada para a CYP2E1 (Tsutsumi, Lasker, Takahashi, & Lieber, 1993).

Ademais, de acordo com a linhagem heterogênica utilizada, o etanol aparenta afetar diferencialmente o encéfalo. Melchior e Myers (1976), utilizando ratos das linhagens H, L-E, S-D e W, investigaram os efeitos da administração intracerebroventricular de 20 µl de soluções com 50 µg de 5,6-diidroxitriptamina (5,6-DHT), 100 µg de 5,7-diidroxitriptamina (5,7-DHT) e 200 µg de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sobre a ingestão voluntária de soluções de etanol. Os referidos autores também mediram o conteúdo de serotonina, norepinefrina e dopamina no estriado, no hipotálamo e no mesencéfalo após a administração das neurotoxinas 5,6 DHT e 6-OHDA ou dos seus respectivos veículos.

Os ratos S-D aumentaram o consumo de etanol após a lesão do sistema serotoninérgico provocada por 5,6-DHT, enquanto que a destruição de neurônios catecolaminérgicos por 6-OHDA reduziu marcadamente a ingestão de etanol em outro grupo de ratos S-D. O padrão de consumo de ratos W não foi afetado pelo 5,6-DHT, mas foi atenuado por 6-OHDA. Os animais da linhagem H apresentaram aumento do consumo após a lesão ocasionada pela 5,6-DHT, mas seu padrão de consumo não foi afetado pela lesão gerada pela 6-OHDA. A administração de 5,7-DHT teve pouco ou nenhum efeito sobre o consumo de álcool em qualquer uma dessas linhagens. Por último, as mudanças encontradas nos padrões de consumo dos ratos L-E foram semelhantes às encontradas nos ratos S-D. É importante salientar que o estudo de Melchior e Myers (1976) tem limitações com relação ao controle da idade dos animais comparados: os animais têm de 90 a 180 dias de idade. Por conta disso, seus achados devem ser interpretados

---

<sup>6</sup> No trabalho de Schoedel, Sellers e Tyndale (2001), os resultados de indução da CYP2B1 pelo etanol poderiam indicar que esta isoenzima também é importante no MEOS de ratos W. Por outro lado, além das CYP2E1, CYP1A2 e CYP2B1, o trabalho de Roberts, Shoaf e Song (1995) indica que o etanol também induz a atividade das CYP1A1 e CYP3A1 em ratos S-D.

com cautela. Ainda assim, o mesmo constitui o único estudo encontrado no qual as linhagens H, S-D, W e L-E foram simultaneamente comparadas. A seguir, outros dados e fatores relacionados ao animal-modelo são analisados e discutidos.

### *3.1.2 Alocação, idade, peso e ciclo circadiano*

Dos 62 artigos selecionados, 50 reportaram o tipo de alocação utilizada na armazenagem dos animais em gaiolas-viveiro. Somente 15 artigos reportaram as idades dos animais no início dos experimentos de MCL. Por outro lado, 52 artigos forneceram alguma medida de peso dos animais: 3 forneceram durante o período de alocação anterior ao MCL e no início dos experimentos, sendo que outro não especificou o período ao qual o peso se refere; 24 relataram somente o peso no período de alocação anterior ao MCL e 24 relataram o peso no início dos experimentos. No que diz respeito ao ciclo claro-escuro implementado e ao horário em que os experimentos foram realizados, 30 artigos forneceram ambos, 15 só forneceram o ciclo claro-escuro e 5 forneceram somente o horário dos experimentos. A Tabela 1.3 dispõe esses dados. Levando-se em conta as diferenças detectadas entre as linhagens, demais dados referentes à categoria animal-modelo foram organizados na tabela citada de acordo com essas diferenças, os protocolos  $C \leq 10$ ,  $C \geq 12$  e os protocolos com fase de pré-exposição ao etanol.

Por conta da (a) baixa frequência de reportagem de dados de idade, (b) de variáveis cronobiológicas e (c) da baixa frequência de dados relacionados às linhagens L, L-E, P, NP e W (Shoe), a análise nessa seção se centra nos dados de alocação e nas linhagens H, S-D e W. O exame visual dos dados de alocação nas gaiolas-viveiro em relação aos resultados de condicionamento reportados sugere que o tipo de alocação pode estar influenciando os resultados das linhagens nos protocolos sem pré-exposição ao etanol. De forma a discriminar a influência de protocolos  $C \geq 12$  dessa possível influência da alocação sobre os resultados, os dados das linhagens H, S-D e W foram selecionados e estratificados por protocolos  $C \leq 10$  e  $C \geq 12$ . A Figura 1.5 dispõe esse arranjo de dados somente para os artigos nos quais o tipo de alocação foi reportado e a Tabela 1.4 dispõe os mesmos dados em porcentagem.

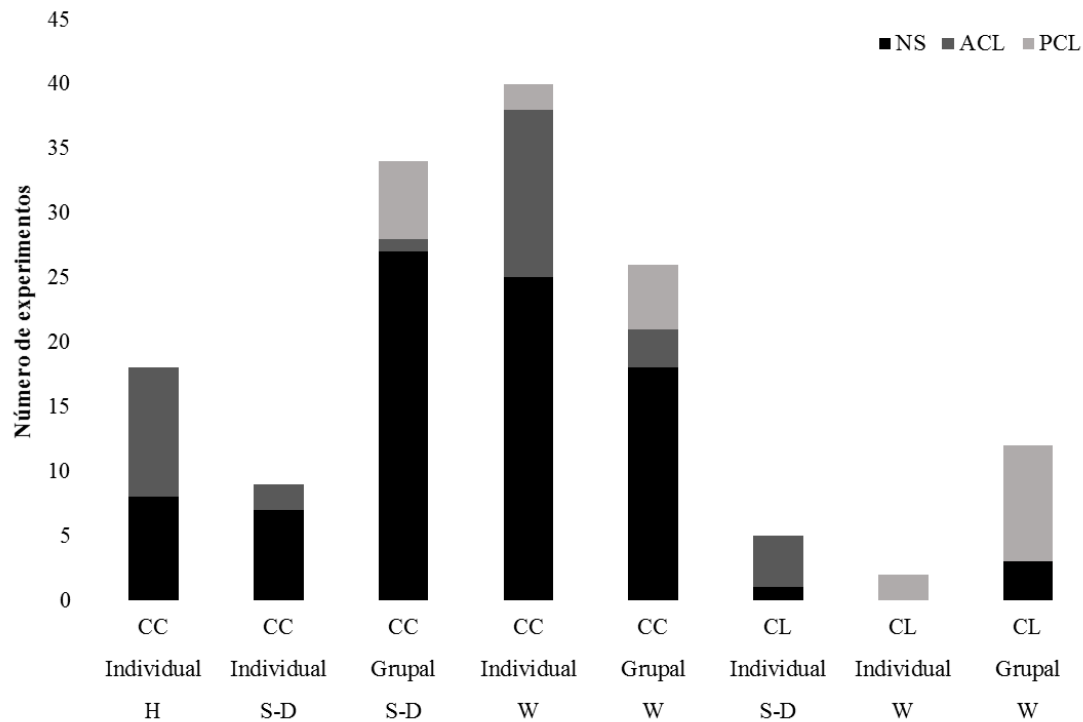
**Tabela 1.3.**

Dados referentes ao animal-modelo utilizado, organizados por linhagem e pela alocação dos animais, subdivididos por tipo de protocolo de condicionamento e pela ausência/presença de fase de pré-exposição ao etanol, seguidos dos resultados experimentais reportados.

Citação	Animal-modelo				Idade (dias)	Fase C	HE	Resultados		
	Lin	A	PA (g)	PE (g)				PCL	ACL	NS
<b>Animais não pré-expostos ao etanol submetidos a protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões</b>										
Cunningham (1981)	H	Individual	NR	NR	100	NR	NR	-	E1-E2	-
Cunningham e Niehus (1993)	H	Individual	[326-480]	[326-480]	NR	0700-1900	Fase C	-	E1-E2, E4-E5	E3, E6
Cunningham <i>et al.</i> (1993)	H	Individual	456	NR	NR	0700-1900	Fase C	-	E1	-
Borman e Cunningham (1997)	H	Individual	355-470	NR	NR	0700-1900	NR	-	E1	E2-E3
Borman e Cunningham (1998)	H	Individual	380-450	NR	NR	0700-1900	NR	-	E2, E5	E1, E3, E4, E6
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	Individual	NR	410	NR	NR	NR	-	-	E8-E10
Busse e Riley (2002)	S-D	Individual	NR	250-400	NR	0800-2000	0900-1400	-	-	E1-E2
Busse <i>et al.</i> (2004)	S-D	Individual	NR	250-400	NR	0800-2000	0900-1600	-	-	E1-E2
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	Individual	NR	250-350	NR	0800-2000	0900-1400	-	E1	-
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	Individual	200	406	NR	1000-2200	1500-1800	-	E2	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	Grupal	NR	NR	65	0700-1900	M e T	E1, E3	-	-
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	Grupal	NR	410	NR	NR	NR	-	-	E1-E7
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	Grupal	NR	NR	60	0700-1900	M e T	E3	-	E1, E5
Bedingfield <i>et al.</i> (1999)	S-D	Grupal	250-300	NR	NR	NR	1300-1800	-	-	E1-E2
Gauvin <i>et al.</i> (1994)	S-D	Grupal	NR	NR	NR	0530-1730	NR	-	E1	-
Gauvin <i>et al.</i> (1997)	S-D	Grupal	NR	NR	NR	0530-1731	NR	-	-	E1-E4
Morales <i>et al.</i> (2012)	S-D	Grupal	NR	NR	69-70	0700-2300	1100-1200	E1-E3	-	E4
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	Grupal	190-230	NR	NR	0800-2000	NR	-	-	E1-E10
Yu <i>et al.</i> (2016)	S-D	Grupal	220-240	290-310	NR	NR	NR	-	-	E1
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	NR	NR	180-300	90-110	NR	M e T	E4, E6	E1, E5	E2-E3
Al Ameri <i>et al.</i> (2014)	W	Individual	NR	NR	NR	0600-1800	M e T	E1	-	-
Bahi e Dreyer (2014)	W	Individual	~220	~220	~70	0600-1801	M e T	E1	-	-
Bieńkowski, Iwinska <i>et al.</i> (1997)	W	Individual	NR	300-330	NR	0600-1802	1000-1400	-	E1	-
Bieńkowski, Kuca <i>et al.</i> (1997)	W	Individual	NR	250-300	NR	0600-1800	NR	-	E1	-
Quertemont <i>et al.</i> (1998)	W	Individual	NR	250-300	NR	1800-0600	1400-1700	-	E1	E2
Quertemont e De Witte (2001)	W	Individual	NR	250-300	NR	1800-0600	1400-1700	-	E3-E4	E1-E2
Stewart e Grupp (1981)	W	Individual	300-350	NR	NR	0700-1900	NR	-	E3	E1-E2
Stewart e Grupp (1985)	W	Individual	300-350	NR	NR	0700-1900	NR	-	E6-E7	E1-E5
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	Individual	250-350	NR	NR	0700-1900	NR	-	E8, E12	E1-E7, E9-E11
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	Individual	250-350	NR	NR	0700-1900	NR	-	E16, E19-E20	E13-E15, E17-E18
Bagrov <i>et al.</i> (1999)	W	Grupal	NR	180-200	NR	C invertido	NR	E1	-	-
Bahi (2013)	W	Grupal	NR	NR	NR	NR	M e T	E2, E4	-	E1, E3
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	Grupal	NR	240-280	NR	0600-1800	1300-1800	E8	-	E1-E5, E9
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	Grupal	NR	200-250	~71	NR	0900-1700	-	-	E1
Martijena <i>et al.</i> (2001)	W	Grupal	260-300	NR	NR	0700-1900	1000-1600	-	-	E1
Morse <i>et al.</i> (2000)	W	Grupal	220-240	NR	[70-80]	0600-1800	1800-2100	-	E2-E3	E1
Patkina e Zvartau (1998)	W	Grupal	NR	180-200	NR	2100-0900	1000-1300	E1	-	-
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	Grupal	240-280	NR	NR	0700-1900	Fase C	-	E4	E1-E3, E5-E8

Citação	Lin	A	PA (g)	PE (g)	Idade (dias)	Fase C	HE	PCL	ACL	NS
Bahi e Dreyer (2013)	W	[Grupal]	NR	NR	NR	0600-1800	M e T	E1	-	-
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	NR	60-70	NR	~57	0800-2000	NR	-	E5, E7	E1, E3
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	NR	220-270	NR	NR	0700-1900	0800-1600	-	-	E1-E9
Cole <i>et al.</i> (2003)	L	Individual	180-210	NR	NR	1400-0200	Fase E	E3-E4	-	E1-E2
Schechter (1991)	P	Individual	NR	200-270	60	0600-1800	NR	-	E1	-
Schechter (1991)	NP	Individual	NR	190-260	60	0600-1800	NR	-	E2	-
Becker <i>et al.</i> (2006)	W (Shoe)	Grupal	NR	NR	~94	0600-1800	NR	-	E2	E1
<b>Animais não pré-expostos ao etanol submetidos a protocolos de condicionamento com 12 ou mais sessões</b>										
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	Individual	NR	NR	~77	0700-1900	Fase C	-	E1-E4	-
Marglin <i>et al.</i> (1988)	S-D	Individual	202	NR	NR	0800-2000	1130-1800	-	-	E1
Haleem <i>et al.</i> (2005)	W	Individual	NR	220-250	NR	0600-1800	NR	E1	-	-
López e Cantora (2010)	W	Individual	NR	453-538	~90	0800-2000	Fase C	E1	-	-
Biała e Lagwiński (1996a)	W	Grupal	200-250	NR	NR	NR	NR	E1	-	-
Bozarth (1990)	L-E	NR	NR	325-375	NR	NR	Fase C	E2	-	E1
Biała e Lagwiński (1996b)	W	Grupal	200-250	NR	NR	NR	NR	E1-E3	-	-
Melis <i>et al.</i> (2007)	W	Grupal	NR	200-250	NR	0800-2000	Fase C	E1	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	Grupal	NR	180-250	NR	0800-2000	0830-1300	E2, E4, E6, E7	-	E1, E3, E5
Bie <i>et al.</i> (2009)	W	NR	150-250	NR	NR	NR	NR	E1-E5	-	E6
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	NR	150-200	NR	NR	NR	NR	E1-E2, E4-E6	-	E3
<b>Animais pré-expostos ao etanol</b>										
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	Individual	NR	250-350	NR	0800-2000	0900-1400	-	E2	-
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	Individual	200	406	NR	1000-2200	1500-1800	E1	-	-
Sable <i>et al.</i> (2004)	S-D	Individual	NR	300-400	60-90	0700-1900	NR	-	-	E1
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	Individual	NR	NR	~77	0700-1900	Fase C	-	E5-E6	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	Individual	NR	NR	~108	0700-1900	Fase C	-	E7-E8	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	Grupal	NR	NR	65	0700-1900	M e T	-	-	E2, E4
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	Grupal	NR	NR	60	0700-1900	M e T	E4	-	E2, E6
Bieńkowski <i>et al.</i> (1995)	W	Grupal	NR	240-300	NR	0600-1800	1400-1800	E1	-	E2
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	Grupal	NR	240-280	NR	0600-1800	1300-1800	E6	-	E7
Biała e Kotłinska (1999)	W	Grupal	200-250	NR	NR	NR	NR	E1-E2	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2007)	W	Grupal	200-250	NR	NR	0800-2000	NR	E1	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2011)	W	Grupal	200-250	NR	NR	NR	NR	E1-E3	-	-
Gibula-Bruzda <i>et al.</i> (2015)	W	Grupal	NR	200-240	NR	NR	NR	E1-E15	-	-
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	Grupal	NR	200-250	~71	NR	0900-1700	E2-E16	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2004)	W	NR	200-250	NR	NR	NR	NR	E1-E2	-	-
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	NR	275-300	NR	~117	0800-2000	NR	-	E6, E8	E2, E4
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	Individual	NR	NR	~90	0600-1800	1800-2000	E2-E3, E6	-	E1, E4-E5, E7-E10
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	Individual	NR	NR	~90	0600-1800	1800-2000	-	-	E11-E14
Ciccocioppo, Panocka, Polidori <i>et al.</i> (1999)	msP	NR	NR	400-450	NR	2200-1000	1000-1200	E1	-	-
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	Individual	NR	NR	~90	0600-1800	1800-2000	-	-	E15-E16

**Nota:** [], dados com identificação duvidosa; **Lin**, linhagem de *Rattus Norvegicus*; **A**, tipo de alocação; **PA**, peso dos animais durante o período de alocação anterior ao protocolo de MCL; **PE**, peso dos animais no início do protocolo de condicionamento ao local; **Fase C**, fase clara do ciclo claro-escuro; **Fase E**, fase escura do ciclo claro-escuro; **HE**, horário dos experimentos de condicionamento ao local; **M e T**, manhã e tarde; **NR**, não relatado; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, não significativo; **H**, linhagem Holtzman; **L**, linhagem Lister; **L-E**, linhagem Long-Evans; **S-D**, linhagem Sprague-Dawley; **W**, linhagem Wistar; **E**, experimento; **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.



**Resultados por linhagem, alocação e extensão do condicionamento**

**Figura 1.5.** Resultados reportados em experimento sem pré-exposição, estratificados segundo a linhagem de *Rattus norvegicus*, a alocação relatada e o tipo de protocolo de condicionamento. **H**, Holtzman; **S-D**, Sprague-Dawley; **W**, Wistar; **NS**, não significativo; **ACL**, aversão condicionada ao local; **PCL**, preferência condicionada ao local; **CC**, condicionamento de curta duração; **CL**, condicionamento de longa duração.

**Tabela 1.4.**

Resultados reportados por linhagem de *Rattus norvegicus* segundo alocação nas gaiolas-viveiro.

Linagem e alocação	Nº PCL	Nº ACL	Nº NS	TOTAL	% PCL	% ACL	% NS
<b>Protocolos de condicionamento com 10 sessões ou menos</b>							
Holtzman Individual	0	10	8	18	0,00	55,56	44,44
Sprague-Dawley Individual	0	2	7	9	0,00	22,22	77,78
Sprague-Dawley Grupal	6	1	27	34	17,65	2,94	79,41
Wistar Individual	2	13	25	40	5,00	32,50	62,50
Wistar Grupal	5	3	18	26	19,23	11,54	69,23
Todas	13	29	85	127	10,24	22,83	66,93
<b>Protocolos de condicionamento com 12 sessões ou mais</b>							
Sprague-Dawley Individual	0	4	1	5	0,00	80,00	20,00
Wistar Individual	2	0	0	2	100,00	0,00	0,00
Wistar Grupal	9	0	3	12	75,00	0,00	25,00
Todas	11	4	4	19	57,89	21,05	21,05

**Nota:** Nº, número de experimentos; %, porcentagem de experimentos; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo.

Os dados dispostos na Figura 1.5 e na Tabela 1.4 sugerem que a alocação individual aumenta a probabilidade de condicionamento de ACL em protocolos  $C \leq 10$  na linhagem W. Os dados sugerem ainda que a alocação individual também diminui a probabilidade de condicionamento de PCL nas linhagens H, S-D e W. Todavia essa última possibilidade pode ser enviesada pelo fato de que as alocações individual e grupal apresentaram distribuição

desigual de aparatos adequados ao condicionamento de PCL, sendo esses mais frequentes na alocação grupal (ver seção 3.2). De maneira a evitar tal enviesamento, os dados de obtenção de PCL foram excluídos nas análises subsequentes que envolveram a alocação individual e em algumas análises que envolveram alocação grupal.

Quando os resultados das 3 linhagens foram comparados segundo a alocação individual excluindo os dados de PCL das linhagens S-D e W, as distribuições dos mesmos não diferiram entre si em protocolos  $C \leq 10$  (teste exato de Fisher = 3,327,  $p = 0,199$ ). Mantendo a exclusão dos dados de PCL, quando as alocações individuais das linhagens foram comparadas em protocolos  $C \leq 10$  a partir da exclusão dos dados de Reid *et al.* (1985) para animais S-D, as distribuições também não diferiram entre si (teste exato de Fisher = 4,546,  $p = 0,112$ ). Ainda nesse arranjo, as linhagens foram comparadas aos pares: S-D vs. H ( $\chi = 4,206$ ,  $p = 0,084$ ); S-D vs. W ( $\chi = 1,471$ ,  $p = 0,403$ ); W vs. H ( $\chi = 2,299$ ,  $p = 0,155$ ). Esses resultados indicam que os efeitos da alocação individual são similares entre as linhagens.

Quando os resultados das linhagens S-D e W foram comparados segundo a alocação grupal, as distribuições dos mesmos também não diferiram (teste exato de Fisher = 1,822;  $p = 0,416$ ). Quando essa comparação foi realizada a partir da exclusão dos dados de Bedingfield *et al.* (1999) e Gauvin *et al.* (1994; 1997) para animais S-D e de Morse *et al.* (2000) e Zarrindast *et al.* (2010)<sup>7</sup> para animais W, as distribuições também não diferiram ( $\chi = 0,616$ ,  $p = 0,481$ ). Esses resultados indicam que os efeitos da alocação grupal são similares entre as linhagens W e S-D.

Quando os resultados de animais W foram comparados pelas alocações individual e grupal dessa linhagem excluindo-se os resultados de PCL, as distribuições não apresentaram diferenças ( $\chi = 2,717$ ,  $p = 0,132$ ). Quando essa comparação foi realizada após a exclusão dos dados de Morse *et al.* (2000) e Zarrindast *et al.* (2010), as distribuições apresentaram diferença significativa (teste exato de Fisher = 4,692,  $p = 0,044$ ). Por conta da baixa frequência de ACL em ambas as alocações, não foram realizadas comparações dos resultados de animais S-D pelas alocações individual e grupal: tal comparação resultaria não significativa, mas não seria confiável. Ainda assim, dado que (a) a distribuição de resultados por sistema de alocação individual não diferiu entre as linhagens S-D e W, e que (b) a distribuição de resultados por sistema de alocação grupal também não diferiu entre essas linhagens, comparação entre a

---

<sup>7</sup> A exclusão dos dados de Bedingfield *et al.* (1999), Gauvin *et al.* (1994; 1997) e Reid *et al.* (1985) para animais S-D e de Morse *et al.* (2000) e Zarrindast *et al.* (2010) para animais W estão relacionadas com as exclusões de dados realizadas na seção 3.1 e, por conseguinte, com as análises realizadas na seção 3.2 e 3.3. Dados de Marglin *et al.* (1989), Fidler *et al.* (2004) e Rezayof *et al.* (2012) já se encontram excluídos.



distribuição grupal S-D e a distribuição individual W pode ser feita. Na comparação com restrição de dados, houve diferença significativa ( $\chi = 9,215$ ,  $p = 0,002$ ). Esses resultados estão em acordo com os resultados encontrados na seção 3.1 e apontam a alocação individual como o motivo pelo qual as linhagens S-D e W diferiram na probabilidade de obtenção de ACL e de NS em protocolos  $C \leq 10$ .

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que as alocações individual e grupal nas gaiolas-viveiro têm efeitos diferenciados sobre a distribuição de resultados das linhagens W e S-D. É provável que tal efeito também ocorra na linhagem H, visto que a distribuição individual desta não resultou diferente das distribuições individuais das outras duas linhagens. Além disso, esses resultados indicam que (a) condicionamento de PCL tem menor probabilidade de ocorrer em ratos cuja alocação é individual, seja porque há aumento da probabilidade de ocorrência de ACL, seja porque há aumento da probabilidade de condicionamento não efetivo, ou ambos; (b) em termos de probabilidade de condicionamento, os resultados de animais S-D e W alocados em grupo são mais comparáveis entre si que com animais das mesmas linhagens armazenados em alocação individual; (c) em termos de probabilidade de condicionamento, os resultados de animais H, S-D e W alocados individualmente são mais comparáveis entre si que com animais das mesmas linhagens armazenados em grupo. Ademais, no caso da linhagem H cujos protocolos de condicionamento só resultaram em ACL e NS, mas somente alocação individual foi reportada, não é possível discernir se esses resultados advêm da linhagem *per se*, do sistema de alocação individual, de outra variável ou ainda de interações entre todos esses fatores. Ainda assim, pela análise aqui realizada é clara a grande possibilidade de influência da alocação individual.

No que diz respeito aos possíveis efeitos da alocação sobre os protocolos  $C \geq 12$  e sobre protocolos com pré-exposição ao etanol, por mais que a maioria dos artigos referentes tenha reportado o sistema de armazenamento, houve baixa frequência de um ou de outro tipo de alocação por tipo de protocolo e por linhagem na amostra revisada para que comparações estatísticas minimamente confiáveis fossem realizadas. Se analisarmos a partir das diferenças acima detectadas os resultados para ratos S-D alocados individualmente e submetidos a protocolos  $C \geq 12$  ou com pré-exposição ao etanol, os dados indicam que esses protocolos têm pouco efeito sobre a alocação individual. Dito de outra maneira, quando ratos S-D são alocados individualmente, protocolos longos de condicionamento (Fidler *et al.*, 2004; Marglin *et al.*, 1988) ou com pré-exposição ao etanol (Busse *et al.*, 2005; Fidler *et al.*, 2004; Sable *et al.*, 2004) não aumentam significativamente a probabilidade de condicionamento de PCL nessa linhagem (mas ver Reid *et al.*, 1985), o que também estaria de acordo com os dados de baixa indução da

CYP1A2 nessa linhagem (Kishida *et al.*, 2008). O mesmo raciocínio é estendível aos dados da linhagem msP, vistos os dados de alocação dessa linhagem e da linhagem P (Schechter, 1992) e os respectivos resultados. Porém, como vem sendo afirmado ao longo das seções de resultados, os protocolos do grupo de Cunningham são demais inusitados para que generalizações populacionais desse tipo possam ser feitas sem base estatística clara para tanto.

É importante salientar que efeitos dos sistemas de alocação não são exclusivos ao MCL com etanol em ratos. De fato, a literatura de MCL indica que animais alocados individualmente ou em grupo demonstram respostas diferentes ao condicionamento ao local a depender (a) da droga empregada como estímulo incondicional, (b) da dose utilizada, (c) do período de desenvolvimento do animal e (d) do período total durante o qual os animais são alocados individual ou grupalmente antes dos experimentos. Por exemplo, ratos L-E alocados individualmente a partir do desmame apresentaram sensibilidade diminuída ao condicionamento ao local com heroína nas doses de 20, 40 ou 80 µg/kg (administração subcutânea) em comparação com animais alocados em grupo: condicionamento de PCL ocorreu nos animais alocados em grupo em todas as 3 doses, enquanto PCL só ocorreu na maior dose para os animais alocados individualmente (Schenk, Hunt, Colle, & Amit, 1983). Adicionalmente, Schenk, Hunt, Malovechko, Robertson e Amit (1986) usaram diferentes grupos de ratos L-E isolados e agrupados no MCL induzido por doses de cocaína (0,31, 0,62, 1,25 ou 2,5 mg/kg, administração subcutânea) ou por doses de d-anfetamina (0,031, 0,063, 0,125, 0,25 ou 0,5 mg/kg, administração subcutânea). Os grupos de animais isolados não obtiveram condicionamento bem-sucedido para nenhuma dose de cocaína, enquanto que todos os animais armazenados em grupo obtiveram PCL. No caso da d-anfetamina, os grupos isolados não obtiveram condicionamento nas doses de 0,063 e de 0,125 mg/kg; demais resultados não diferiram, ocorrendo PCL em ambos os casos.

Esses dados de Schenk *et al.* (1983) para ratos L-E apontam para possíveis diferenças na densidade de receptores opioides estabelecidas a partir do sistema de armazenagem dos animais. De fato, Schenk, Britt, Atalay e Charleson (1982) mostraram que ratos da linhagem pigmentada Royal Victoria acondicionados individualmente têm menor densidade de receptores opioides (medida por ensaios de ligação com naloxona) que ratos da mesma linhagem acondicionados em grupo. Caso esses dados sejam válidos para as linhagens albinas, e como a ativação de receptores opioides está relacionada com o reforçamento por etanol (Koob & Le Moal, 2006), pode-se supor que a alocação individual, ao diminuir a densidade de receptores opioides, esteja diminuindo o valor reforçador do etanol ou aumentando suas propriedades aversivas no MCL.

Por outro lado, frente aos dados de Schenk *et al.* (1983), de Bardo *et al.* (1995) e de Schenk, Ellison, Hunt e Amit (1985), também é importante salientar as limitações do dado de alocação utilizado nesse estudo. A maioria dos estudos revisados não reporta o tempo durante o qual os ratos foram alocados individual ou grupalmente em seus biotérios. De fato, sequer é possível saber se esses ratos sempre estiveram alocados em grupo ou em separado após o desmame antes de chegarem aos biotérios de armazenamento dos laboratórios em questão: (a) a grande maioria dos animais utilizados foi adquirida de biotérios de reprodução particulares, (b) não há relato na literatura dos sistemas de alocação implementados por esses criadouros, (c) sendo provável que as práticas de alocação implementadas por cada criadouro difiram no espaço e no tempo. Portanto, o dado acerca de alocação é puramente categórico e só se embasa nas afirmativas dos pesquisadores.

Ademais, no início da discussão dos dados de Schenk *et al.* (1983), foi dito que os efeitos no MCL do sistema de alocação dependem do período de desenvolvimento e da duração total da alocação em separado ou em grupo (Schenk *et al.*, 1985). Conforme relatado no início dessa seção e como pode ser visto na Tabela 1.3, a idade dos animais está ausente na maioria dos estudos revisados, o que limita ainda mais a confiabilidade do dado de alocação aqui analisado em relação aos dados de Schenk *et al.* (1983). Ainda assim, é surpreendente que a distribuição de resultados por sistema de alocação tenha sido desigual a ponto de alcançar o critério de significância para as linhagens H, S-D e W, mesmo diante de todas as limitações apontadas no dado. Sendo provável que tenham sido usados animais de diferentes idades alocados individual ou coletivamente<sup>8</sup>, os efeitos relatados por Schenk *et al.* (1983) não são suficientes para explicar esse fator.

Assim, é possível que tal efeito também esteja relacionado com os dados de Arakawa (2003; 2005) acerca dos efeitos de interação dos fatores isolamento e idade sobre o comportamento exploratório de ratos. Arakawa (2003) realizou uma série de experimentos de isolamento nos quais diferentes grupos de ratos W de diferentes idades (40, 65 e 130 dias de idade) alocados individualmente por diferentes períodos em diferentes idades (ratos de 40 dias: 26-40, 39-40; ratos de 65 dias: 26-65, 26-40, 51-65, 64-65; ratos de 130 dias: 26-130, 26-40,

---

<sup>8</sup> A comparação dos pesos reportados para as linhagens W, S-D e H com curvas de crescimento para linhagens albinas heterogênicas (Cossio-Bolaños, Campos, Vitoria, Fogaça, & de Arruda, 2013; Huges & Tanner, 1970; Pahl, 1969) indica grande probabilidade de ratos de diferentes idades terem sido utilizados, com variação de idade estimada entre 45 e 120 dias. Todavia, como há grande variação de peso por idade entre as linhagens e dentro da mesma linhagem (Kacew & Festing, 1999; Sengupta, 2013), esses dados só podem ser tomados como referência e não como predição.

51-130, 116-130, e 129-130) foram testados no campo aberto. Quando separados nos períodos 26-40 e 26-65, ratos de diferentes idades (40, 65 e 130) apresentaram comportamento exploratório diminuído. Ratos separados nos períodos 51-65 e 51-130 não apresentaram diferença quando testados aos 65 e 130 dias de idade, respectivamente. Ratos de 130 dias de idade separados nos períodos 116-130 e 129-130 apresentaram aumento do comportamento exploratório. Todas as comparações foram realizadas entre grupos de mesma idade e com ratos alocados aos pares com mesma idade dos grupos experimentais.

Dessa maneira, é possível que tais modificações de comportamento exploratório estejam interagindo com o formato e com as dimensões dos aparatos de condicionamento utilizados no MCL. Portanto, considerando esses últimos argumentos, as diferenças encontradas não podem ser facilmente ignoradas ou descartadas e foram levadas em conta na organização dos dados para análise descritiva de aparatos realizada na seção 3.2.

### 3.2 APARATOS DE MCL

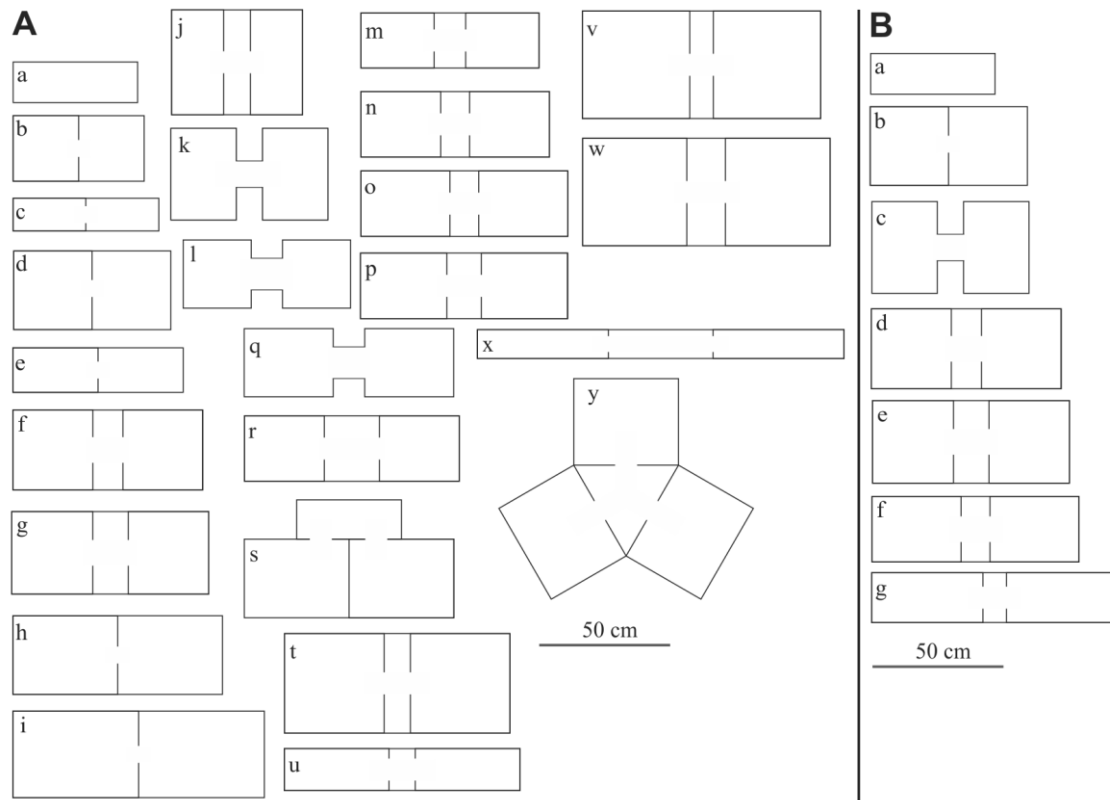
Os aparatos têm variado em número de câmaras, de 1 a 4. No caso dos aparatos com 3 câmaras, a câmara de acesso pode estar disposta lateral ou serialmente às câmaras distais e possuir comprimento, largura e altura diferente das apresentadas pelas câmaras distais, podendo ser menos comprida, larga ou alta. No caso do aparato com 4 câmaras, 3 câmaras distais são dispostas radialmente em relação à câmara de acesso, sendo que esta apresenta formato triangular. Os aparatos também diferem no número e nas modalidades de estímulos empregados ao condicionamento (textura de pisos e paredes, coloração de paredes, odores e iluminação) e na controversa tendência destes estímulos serem atrativos/aversivos *per se* ou indiferenciados (aparatos *com viés* ou *sem viés*, respectivamente). Em referência à variação de dimensões, a Figura 1.6 ilustra as plantas baixas dos aparatos dos artigos que informaram as dimensões dos mesmos.

No exame visual da Figura 1.6 percebe-se que a variação das dimensões tem efeitos tanto para as áreas quanto para os formatos (quadrado ou retangular) dos aparatos como um todo e das câmaras de condicionamento em particular. Dados do campo aberto indicam que respostas ambulatorias<sup>9</sup> de ratos tendem a aumentar (em frequência e duração) de acordo com o aumento da área do aparato, mas a se restringir às periferias (Walsh & Cummins, 1976). Além

---

<sup>9</sup> O comportamento ambulatorio de ratos está relacionado com o número e duração de cada “visita” (*sojourns*) que o animal realiza às câmaras de condicionamento ao longo das sessões de linha de base e de teste e com o tempo de permanência total (*toujourn*) dos animais nas câmaras de condicionamento nessas mesmas sessões.

disso, o componente tigmotáxico do comportamento ambulatório aparenta influenciar diferencialmente a duração e a frequência de respostas como levantamento (*rearing*) e auto-limpeza (*grooming*) (Lamprea, Cardenas, Setem & Morato, 2008; Mackintosh, Chance & Silverman, 1977; Walsh & Cummins, 1976).



**Figura 1.6.** Visão de plantas baixas de diferentes aparatos de MCL com etanol em ratos.

**A.** Aparatos empregados em protocolos de MCL sem fase de pré-exposição ao etanol: **a**, Borman e Cunningham (1997; 1998), Cunningham e Niehus (1993), Cunningham *et al.* (1993), Fidler *et al.* (2004); **b**, Patkina e Zvartau (1998); **c**, Cunningham (1981); **d**, Al Ameri *et al.* (2014), Bagrov *et al.* (1999), Bahi (2013), Bahi e Dreyer (2013; 2014), Ise *et al.* (2013); **e**, Marglin *et al.* (1988); **f**, Busse *et al.* (2005); **g**, Pascual *et al.* (2012); **h**, López e Cantora (2010); **i**, Melis *et al.* (2007), Peana *et al.* (2008); **j**, Zuo *et al.* (2017); **k**, Biała e Lagwiński (1996a; 1996b), Gawel *et al.* (2016); **l**, Haleem *et al.* (2005); **m**, Cole *et al.* (2003); **n**, Morales *et al.* (2012); **o**, Asin *et al.* (1985), Bieńkowski, Iwinska *et al.* (1997), Bieńkowski, Kuca *et al.* (1997); **p**, Martijena *et al.* (2001); **q**, Quertemont *et al.* (1998), Quertemont e De Witte (2001); **r**, Yu *et al.* (2016); **s**, Rezayof *et al.* (2012), Zarrindast *et al.* (2010); **t**, Stewart e Grupp (1981; 1985); **u**, Bedingfield *et al.* (1999); **v**, Van der Kooy *et al.* (1983); **w**, Busse e Riley (2002), Busse *et al.* (2004); **x**, Becker (2006); **y**, Morse *et al.* (2000). **B.** Aparatos empregados em protocolos de MCL com fase de pré-exposição ao etanol: **a**, Fidler *et al.* (2004); **b**, Ciccocioppo, Panocka, Frolidi *et al.* (1999), Ciccocioppo, Panocka, Polidori *et al.* (1999); **c**, Biała e Kotłinska (1999), Gawel *et al.* (2016), Gibula-Bruzda *et al.* (2015), Kotłinska *et al.* (2004; 2007; 2011); **d**, Busse *et al.* (2005); **e**, Pascual *et al.* (2012); **f**, Bieńkowski *et al.* (1995; 1996); **g**, Reid *et al.* (1985).

Poucos artigos relataram a ordem de dimensões (CxLxA, LxCxA, AxCxL etc.) na descrição de aparatos empregados e, nestes poucos, as ordens relatadas variaram: para L x C x A, ver Ise *et al.*, 2013; para C x L x A, ver Cunningham, 1981; para A x C x L ou A x L x C, ver Ciccocioppo *et al.*, 1999. Nos casos em que (a) a ordem das dimensões não foi reportada, (b) não foi possível inferi-la da comparação com as dimensões das câmaras de condicionamento e (c) não houve indicação de bibliografia que descrevesse o aparato, as plantas baixas dos aparatos não foram incluídas na composição da figura. Esquema gráfico baseado em Carr *et al.* (1989).

Portanto, formato e tamanho das câmaras de condicionamento (nos aparatos com 1, 2, 3 ou 4 câmaras) e da câmara de acesso (nos aparatos com 3 ou 4 câmaras) também podem influenciar os resultados obtidos: (a) quanto maior a duração e/ou a frequência de levantamentos e de autolimpeza numa câmara, maior a possibilidade de o animal permanecer

mais tempo na mesma; (b) câmaras com grandes áreas tendem a estereotipar o comportamento ambulatorio dos ratos de forma que estes fiquem mais tempo em contato com as paredes (tigmotaxia positiva), o que indica efeitos aversivos da área; (c) aparatos e/ou câmaras de condicionamento em estilo corredor podem diminuir a probabilidade de ambulação por aumentarem a probabilidade de levantamentos e de autolimpeza; (d) câmaras de acesso em estilo corredor podem diminuir a probabilidade de exploração horizontal de uma câmara distal em relação à outra ao longo das sessões de linha de base e de teste, especialmente quando o estilo corredor é de pequena altura.

Assim sendo, os dados de comprimento e largura das câmaras de condicionamento foram utilizados no cálculo da área e da razão comprimento/largura. O cálculo da razão serve de índice de formato: quanto mais próximo de 1, mais próximo o formato de quadrado regular; quanto mais distante, mais retangular o formato. Além disso, o índice também indica em qual das dimensões ocorre o aumento: valores menores que 1 indicam aumento da largura e valores maiores que 1 indicam aumento do comprimento das câmaras de condicionamento.

A Tabela 1.5 dispõe os dados dos aparatos de MCL e das câmaras de condicionamento, bem como os cálculos de área e de razão relacionados com as câmaras de condicionamento. Também fornece a organização espacial das câmaras de condicionamento e de acesso, se o aparato possui ou não viés e as modalidades estimulatórias empregadas como estímulo condicionado. Os dados se encontram organizados segundo o tipo de alocação, os protocolos  $C \leq 10$ ,  $C \geq 12$  e protocolos de condicionamento associados com fase de pré-exposição ao etanol.

De maneira a estabelecer critérios à análise estatística das relações que (a) comprimento e largura dos aparatos e (b) comprimento, largura, área e formato das câmaras mantêm com a distribuição de resultados, primeiramente tomou-se para análise descritiva os resultados de animais alocados em grupo nas gaiolas-viveiro e submetidos a protocolos  $C \leq 10$ . Posteriormente, generalizações e comparações foram feitas com os dados de protocolos  $C \geq 12$  e com fase de pré-exposição. Em sequência, os mesmos procedimentos foram aplicados na análise de dados de animais alocados individualmente. Por outro lado, ao longo da análise discursiva, foi necessário fazer referência a dados da seção 3.3. Esses dados foram aludidos de forma que o leitor compreendesse os motivos das sucessivas organizações de dados dos aparatos e análises estatísticas correspondentes.

**Tabela 1.5.**

Dados dos aparatos de MCL organizados por tipo de alocação nas gaiolas-viveiro e pelo comprimento dos aparatos, subdivididos por tipo de protocolo de condicionamento e pela ausência/presença de fase de pré-exposição ao etanol, seguidos dos resultados experimentais reportados.

Citação	Aparatos de MCL				Câmaras de condicionamento					Resultados			
	A-M Lin	NC	Disp	TA	CEC	DA (CxL cm)	DC (CxL cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	C/L	ME (CS)	PCL	ACL	NS
<b>Animais alocados individualmente submetidos a protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões</b>													
Cunningham e Niehus (1993)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E1-E2	E3
Cunningham e Niehus (1993)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E4-E5	E6
Cunningham <i>et al.</i> (1993)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,6x15,5	47,6x15,5	736,25	3,06	T	-	E1	-
Borman e Cunningham (1997)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E1	E2-E3
Borman e Cunningham (1998)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E2	E1, E3
Borman e Cunningham (1998)	H	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E5	E4, E6
Cunningham (1981)	H	2	Serial	Sem viés	Bl	55,6x12,5	27,8x12,5	347,50	2,22	V e T	-	E1-E2	-
Al Ameri <i>et al.</i> (2014)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	E1	-	-
Bahi e Dreyer (2014)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	E1	-	-
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	72,4x30,5	30,5x30,5	930,25	1,00	V e T	-	E1	-
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V	-	-	E8-E10
Bieńkowski, Iwinska <i>et al.</i> (1997)	W	3	Serial	Com viés	MaTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V e T	-	E1	-
Bieńkowski, Kuca <i>et al.</i> (1997)	W	3	Serial	Com viés	MaTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V e T	-	E1	-
Stewart e Grupp (1981)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	86x38	38x38	1444,00	1,00	V, T e O	-	E3	E1-E2
Stewart e Grupp (1985)	W	3	Serial	Com viés	Bl	86x38	38x38	1444,00	1,00	V, T e O	-	E6-E7	E1-E5
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	94x19	42,5x19	807,50	2,24	V e T	-	E2	-
Busse e Riley (2002)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	94,5x41	40x41	1640,00	0,98	V e T	-	-	E1-E2
Busse <i>et al.</i> (2004)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	94,5x41	40x41	1640,00	0,98	V e T	-	-	E1-E2
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	91x41	41x41	1681,00	1,00	V	-	E8	E1-E7
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	91x41	41x41	1681,00	1,00	V	-	E12	E9-E11
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	91x41	41x41	1681,00	1,00	V	-	E16	E13-E15
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	91x41	41x41	1681,00	1,00	V	-	E19-E20	E17-E18
Quertemont <i>et al.</i> (1998)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	A: 12x12	34x26	884,00	1,31	O	-	E1	E2
Quertemont e De Witte (2001)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	A: 12x12	34x26	884,00	1,31	O	-	E3-E4	E1-E2
Cole <i>et al.</i> (2003)	L	3	Serial	Com viés	MeTP	68x21	28x21	588,00	1,33	V e T	E3-E4	-	E1-E2
Schechter (1991)	P	3	Serial	Com viés	MaTP	NR	[20,5x30,5]	-	-	V e T	-	E1	-
Schechter (1991)	NP	3	Serial	Com viés	MaTP	NR	[20,5x30,5]	-	-	V e T	-	E2	-
<b>Animais alocados em grupo submetidos a protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões</b>													
Patkina e Zvartau (1998)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	50x25	25x25	625,00	1,00	V e T	E1	-	-
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	60x20	30x20	600,00	1,50	V e T	E3	-	E1, E5
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	60x20	30x20	600,00	1,50	V	E1, E3	-	-
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	-	-	E1-E10

Citação	Lin	NC	Disp	TA	CEC	DA (CxL cm)	DC (CxL cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	C/L	ME (CS)	PCL	ACL	NS
Bagrov <i>et al.</i> (1999)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	E1	-	-
Bahi (2013)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	E2, E4	-	E1, E3
Bahi e Dreyer (2013)	W	2	Serial	Sem viés	Bl	60x30	30x30	900,00	1,00	V e T	E1	-	-
Morales <i>et al.</i> (2012)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	72x25	30,5x25	762,50	1,22	V	E1-E3	-	E4
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V	-	-	E1-E7
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	1156,00	1,00	V e T	-	-	E1-E5
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	1156,00	1,00	V e T	E8	-	E9
Martijena <i>et al.</i> (2001)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	79x25	33x25	825,00	1,32	V e T	-	-	E1
Yu <i>et al.</i> (2016)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	82x25	30,5x25	762,50	1,22	V e T	-	-	E1
Gauvin <i>et al.</i> (1994)	S-D	3	Serial	Com viés	MeTP	90x16	40x16	640,00	2,50	V e T	-	E1	-
Gauvin <i>et al.</i> (1997)	S-D	3	Serial	Com viés	MaTP	90x16	40x16	640,00	2,50	V e T	-	-	E1, E3
Gauvin <i>et al.</i> (1997)	S-D	3	Serial	Com viés	MeTP	90x16	40x16	640,00	2,50	V e T	-	-	E2, E4
Bedingfield <i>et al.</i> (1999)	S-D	3	Serial	Com viés	MeTP	90x16	40x16	640,00	2,50	V e T	-	-	E1-E2
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V e T	-	-	E1
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	3	Lateral	Sem viés	Bl	A: 40x15	40x30	1200,00	1,33	V e T	-	E4	E1-E3
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	3	Lateral	Sem viés	Bl	A: 40x15	40x30	1200,00	1,33	V e T	-	-	E5-E8
Morse <i>et al.</i> (2000)	W	4	Radial	Sem viés	Bl	A: triangular	40x33	1320,00	1,21	V e T	-	E2-E3	E1
Becker <i>et al.</i> (2006)	W (S)	3	Serial	Com viés	MeTP	140x11	50x11	550,00	4,55	V e T	-	E2	E1
<b>Animais de alocação não relatada submetidos a protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões</b>													
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	50x40	20x40	800,00	0,50	V e T	E4, E6	E1, E5	E2-E3
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	75,2x31,5	30,7x31,5	967,05	0,97	V e T	-	E5, E7	E1, E3
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	3	Lateral	Sem viés	Bl	A: 40x15	40x30	1200,00	1,33	V e T	-	-	E1-E9
<b>Animais alocados individualmente submetidos a protocolos de condicionamento com 12 ou mais sessões</b>													
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E1-E4	-
Marglin <i>et al.</i> (1988)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	65x17	32,5x17	552,50	1,91	V e T	-	-	E1
López e Cantora (2010)	W	2	Serial	Com viés	MeTP	80x30	40x30	1200,00	1,33	T	E1	-	-
Haleem <i>et al.</i> (2005)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 12x12	26x26	676,00	1,00	V	E1	-	-
<b>Animais alocados em grupo submetidos a protocolos de condicionamento com 12 ou mais sessões</b>													
Melis <i>et al.</i> (2007)	W	2	Serial	Com viés	MeTP	96x33	48x33	1584,00	1,45	V e T	E1	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	2	Serial	Com viés	MeTP	96x33	48x33	1584,00	1,45	V e T	E2, E4	-	E1, E3
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	2	Serial	Com viés	MeTP	96x33	48x33	1584,00	1,45	V e T	E6-E7	-	E5
Biała e Lagwiński (1996a)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	1,40	V e T	E1	-	-
Biała e Lagwiński (1996b)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	1,40	V	E1-E3	-	-
<b>Animais de alocação não relatada submetidos a protocolos de condicionamento com 12 ou mais sessões</b>													
Bie <i>et al.</i> (2009)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	70x21	28x21	588	1,33	V e T	E1-E5	-	E6
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	3	Serial	Com viés	MaTP	70x21	28x21	588	1,33	V e T	E2	-	-
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	70x21	28x21	588	1,33	V e T	E1	-	E3
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	70x21	28x21	588	1,33	V e T	E4-E6	-	-



Citação	Lin	NC	Disp	TA	CEC	DA (CxL cm)	DC (CxL cm)	Área (cm <sup>2</sup> )	C/L	ME (CS)	PCL	ACL	NS
Bozarth (1990)	L-E	2	Serial	Com viés	MeTP	[25x36]	NR	-	-	T	E2	-	E1
<b>Animais alocados individualmente e pré-expostos ao etanol</b>													
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E5-E6	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	1	NA	Sem viés	Bl	47,5x15,5	47,5x15,5	736,25	3,06	T	-	E7-E8	-
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	72,4x30,5	30,5x30,5	930,25	1,00	V e T	-	E2	-
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	3	Serial	Sem viés	Bl	94x19	42,5x19	807,50	2,24	V e T	E1	-	-
Sable <i>et al.</i> (2004)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	NR	[28x31]	-	-	V e T	-	-	E1
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V	E2-E3, E6	-	E1, E4-E5
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V	E6	-	E7-E10
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V	-	-	E11-E14
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	msP	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V	-	-	E15-E16
<b>Animais alocados em grupo e pré-expostos ao etanol</b>													
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	60x20	30x20	600,00	1,50	V	-	-	E2, E4
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	2	Serial	Sem viés	Bl	60x20	30x20	600,00	1,50	V e T	E4	-	E2, E6
Bieńkowski <i>et al.</i> (1995)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V e T	E1	-	E2
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	79x25	34x25	850,00	1,36	V e T	E6	-	E7
Biała e Kotłinska (1999)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V	E1-E2	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2007)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V	E1	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2011)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V	E1-E3	-	-
Gibula-Bruzda <i>et al.</i> (2015)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V e T	E1-E15	-	-
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V e T	E2-E16	-	-
<b>Animais de alocação não relatada e pré-expostos ao etanol</b>													
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	3	Serial	Sem viés	Bl	75,2x31,5	30,7x31,5	967,00	0,97	V e T	-	E6, E8	E2, E4
Kotłinska <i>et al.</i> (2004)	W	3	Serial	Com viés	MeTP	A: 10x10	25x35	875,00	0,71	V	E1-E2	-	-
Ciccocioppo, Panocka, Polidori <i>et al.</i> (1999)	msP	2	Serial	Com viés	MeTP	60x30	30x30	900,00	1,00	V	E1	-	-

**Nota:** [], dados com identificação duvidosa; **Lin**, linhagem de *Rattus norvegicus*; **NC**, número de câmaras; **Disp**, disposição das câmaras; **TA**, tipo de aparato; **CEC**, critério de escolha da câmara pareada com etanol; **DA**, dimensões do aparato; **DC**, dimensões das câmaras de condicionamento; **C/L**, razão comprimento/largura; **ME (CS)**, modalidades estimulatórias empregadas como estímulo condicional; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, não significativo; **Bl**, balanceamento de pareamento de câmara; **MeTP**, menor tempo de permanência; **MaTP**, maior tempo de permanência; **A**, câmara de acesso com dimensões (CxL) menores; **O**, estímulo olfativo; **T**, estímulo tátil; **V**, estímulo visual; **NR**, não relatado; **H**, linhagem Holtzman; **L**, linhagem Lister; **L-E**, linhagem Long-Evans; **S-D**, linhagem Sprague-Dawley; **W**, linhagem Wistar; **W (S)**, linhagem Wistar (shoe); **E**, experimento; **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.

Em animais alocados em grupos e submetidos a protocolos  $C \leq 10$ , nota-se que PCL foi relatada em 12 experimentos realizados por 6 grupos de pesquisa. Dentre esses, o caso de condicionamento de PCL relatado por Bieńkowski *et al.* (1996) deve ser analisado em separado por conta de os animais terem recebido 20 administrações intraperitoneais de solução salina na fase de pré-exposição: o relato ilustra a interação entre estresse subcrônico, dose de etanol administrada e aparato utilizado sobre os resultados obtidos no MCL. Nos outros 11 experimentos, a área das câmaras de condicionamento varia de 600 a 900 cm<sup>2</sup> e as dimensões (C x L) das câmaras são 25 x 25, 30 x 20, 30 x 30 e 30,5 x 25 cm. Os índices de formato associados são 1,0, 1,5, 1,0 e 1,22, respectivamente. Os comprimentos dos aparatos de duas câmaras vão de 50 a 60 cm e as larguras vão de 20 a 30 cm. No caso do aparato de 3 câmaras, tendo a câmara de acesso a mesma largura das câmaras de condicionamento, o comprimento é de 72 cm e a largura de 25 cm. Se incluirmos na análise os dados reportados por Zuo *et al.* (2017), os aparatos de 3 câmaras têm ranque de comprimento de 60 a 72 cm e de largura de 25 a 40 cm e os índices têm ranque de 0,5 a 1,5.

É importante salientar que, apesar de os protocolos de condicionamento utilizados por esses grupos possuírem grandes similaridades entre si, quando esses protocolos foram aplicados por outros pesquisadores em conjunto com aparatos de outras especificações, em nenhum caso PCL foi obtida. Por outro lado, Ise *et al.* (2013) reportou 10 falhas de condicionamento empregando aparato de condicionamento que está dentro desses mesmos parâmetros. Todavia essas falhas aparentam estar relacionadas com covariáveis do protocolo de condicionamento (ver seção 3.3). Assim sendo, aparatos com essas especificações associados com certos protocolos parecem ser preponderantes à obtenção de PCL.

Se compararmos os dados dos aparatos dos 8 artigos que reportaram PCL com os dados de Asin *et al.* (1985), Martijena *et al.* (2012) e com os dados de experimentos sem pré-exposição de administração subcrônica de salina relatados por Bieńkowski *et al.* (1996; E1-E3), percebemos que na medida que os aparatos aumentam de comprimento (de 72 para 79 cm) menor é a chance de condicionamento de PCL bem como de condicionamento bem-sucedido no geral, por mais que larguras, áreas e índices de formato das câmaras de condicionamento estejam dentro dos parâmetros relatados por aqueles que reportaram PCL. Ou seja, percebemos que o aumento do comprimento das câmaras de condicionamento influencia negativamente a efetividade do condicionamento de PCL em protocolos  $C \leq 10$  e aumentam a probabilidade de ocorrência de NS e de ACL.

Com 75,2 cm de comprimento, câmaras de condicionamento com dimensões de 30,7 x 31,5 cm (área de 967,05 cm<sup>2</sup>) e índice de 1,03, o aparato de Pascual *et al.* (2012) parece estar

no limite entre uma influência e outra. Tal como no caso de Ise *et al.* (2013), as covariáveis presentes no protocolo de condicionamento parecem ser preponderantes à obtenção de um ou de outro resultado em aparatos dentro dos parâmetros descritos para PCL (vide seção 3.3 e capítulo 2). Por outro lado, o aparato de Yu *et al.* (2016) apresenta comprimento de 82 cm, mas nesse caso é o comprimento da câmara de acesso que aumenta: Morales *et al.* (2012) e Zuo *et al.* (2017) também utilizaram aparatos de 3 câmaras, mas suas câmaras de acesso têm 12 x 25 cm e 10 x 40 cm, respectivamente, enquanto a de Yu *et al.* (2016) tem 21 x 25 cm.

Nos casos de Zarrindast *et al.* (2010) e Rezayof *et al.* (2012), ainda que estes pesquisadores tenham utilizado aparato com câmara de acesso lateralmente disposta, as duas observações anteriores são aplicáveis: ambos utilizaram aparato com câmaras de condicionamento de 40 x 30 cm (área de 1200 cm<sup>2</sup>) e câmara de acesso com 40 x 15 cm. De outra maneira, o caso de Gauvin *et al.* (1997) é difícil de discernir por conta dos protocolos de condicionamento utilizados: o intervalo entre estímulos utilizado foi de -1080 min. Ainda assim, Gauvin *et al.* (1994) e Bedingfield *et al.* (1999) utilizaram protocolos de condicionamento mais usuais e o mesmo aparato estilo corredor que Gauvin *et al.* (1997). Portanto, pode-se julgar inadequado o aparato estilo corredor por conta da relação comprimento (90 cm) e largura (16 cm) que resultou num índice de 2,5 para as câmaras de condicionamento. Mais adiante, pode ser visto que o aparato de Gauvin *et al.* (1994; 1997) e de Bedingfield *et al.* (1999) mantém relação com os aparatos utilizados por Becker *et al.* (2006) e pelos grupos de Cunningham e de L. D. Reid.

O caso do aparato com câmara de acesso estilo corredor utilizado por Gawel *et al.* (2016) abre caminho à discussão dos dados acima resumidos em relação aos protocolos  $C \geq 12$  e com fase de pré-exposição ao etanol. Falha de condicionamento foi reportada quando Gawel *et al.* (2016) utilizaram aparato com câmara de acesso estilo corredor, empregando protocolo curto sem fase de pré-exposição ao etanol. Todavia, quando empregaram fase de pré-exposição ao etanol, mantidas demais variáveis dentro dos mesmos parâmetros, Gawel *et al.* (2016) reportaram 15 experimentos cujos resultados são PCL. Esses dados podem indicar que a câmara de acesso estilo corredor dificulta o estabelecimento de PCL em protocolos curtos de condicionamento. De fato, também podemos comparar (a) os resultados de protocolos  $C \leq 10$  em aparatos mais longos com (b) os resultados de aparatos de maior comprimento de (1) protocolos  $C \geq 12$  e de (2) protocolos com fase de pré-exposição ao etanol. Nesse caso, percebemos que as influências deletérias do aumento de comprimento do aparato, das dimensões da câmara de condicionamento e da câmara de acesso estilo corredor são superadas pela extensão do histórico de contato do animal com o etanol, seja por meio de pré-exposição

ao etanol, seja por meio da extensão do protocolo de condicionamento. Para protocolos  $C \geq 12$ , isso pode ser visto em Melis *et al.* (2007), Peana *et al.* (2008), Biała e Lagwiński (1996a; 1996b). Para protocolos com fase de pré-exposição ao etanol, pode ser visto em Bieńkowski *et al.* (1995; 1996), Biała & Kotłinska (1999), Kotłinska *et al.* (2004; 2007; 2011), Gibula-Brezda *et al.* (2015) e Gawel *et al.* (2016). Todos os aparatos citados estão além dos parâmetros de obtenção de PCL em protocolos  $C \leq 10$  e, entretanto, quando o histórico de contato com o etanol é maior, o condicionamento nesses aparatos resulta em PCL.

No que se refere aos animais alocados individualmente, o padrão verificado nos animais alocados em grupo também se apresenta. Somente os grupos de A. Bahi e de J. C. Cole reportaram 4 experimentos que resultaram em PCL, 2 para animais W e outros 2 para animais L. Em ambos os grupos, os aparatos estão dentro dos parâmetros descritos como adequados à aquisição de PCL para animais alocados em grupo. Na medida em que os aparatos aumentam de comprimento, aumenta o número de reportagens de ACL e, em especial, de NS. É interessante notar que Busse *et al.* (2005) usou aparato de 72,4 cm de comprimento e só obteve ACL. Esse resultado pode estar relacionado com o sistema de alocação utilizado por Busse *et al.* (2005) e o aumento do comprimento dos aparatos, indicando que na medida em que o comprimento aumenta, animais alocados individualmente têm maior probabilidade de condicionamento de ACL ou de NS. Outra variável que pode estar influenciando os resultados de Busse *et al.* (2005) é discutida no Capítulo 2 deste trabalho.

Quando os aparatos apresentam câmara de acesso estilo corredor, também há aumento de frequência de reportagem de ACL e de NS. Todavia deve-se considerar que o protocolo de MCL empregado por Quertemont *et al.* (1998) e por Quertemont e De Witte (2001) difere consideravelmente dos usualmente utilizados na literatura. Além disso, a extensão do histórico de contato com etanol também parece aumentar a probabilidade de condicionamento de PCL nos casos de aparatos longos e de aparatos com câmara de acesso estilo corredor, mas somente quando a extensão do histórico se dá por aumento do número de sessões de condicionamento (López & Cantora; 2010; Haleem *et al.*, 2005). Em relação aos dados de animais acondicionados em grupo, essa restrição de efeito nos animais isolados pode ser explicada por dois fatores não mutuamente excludentes. Primeiro, em animais alocados individualmente, somente o aumento do número de sessões de condicionamento aumenta a probabilidade de produção de PCL. Segundo, os resultados reportados para animais alocados individualmente indicam diferenças de sensibilidade ao etanol entre as linhagens W e S-D: todos os dados citados para protocolos  $C \geq 12$  e para protocolos com fase de pré-exposição ao etanol para

alocação em grupo provêm de animais W, enquanto que na alocação individual os resultados para protocolos com fase de pré-exposição ao etanol provêm de animais S-D.

Por outro lado, nos dados dos animais alocados individualmente também há maior ocorrência de aparatos que, como um todo, têm o formato no estilo corredor. Isso ocorre por conta dos aparatos utilizados pelo grupo de Cunningham (Cunningham, 1981; Cunningham & Niehus, 1993; Cunningham *et al.*, 1993; Bormann & Cunningham, 1997; 1998) e pelo grupo de L. D. Reid (Reid *et al.*, 1985; Marglin *et al.*, 1988). Nesses casos, 3 ocorrências são discerníveis. Em primeiro, há uma redução da largura total dos aparatos ( $< 20$  cm) em relação às larguras comumente presentes nos demais aparatos ( $\geq 20$  cm). Em segundo, por conta dessa redução de largura, as câmaras de condicionamento apresentam índice de formato de 1,91 (Marglin *et al.*, 1988), 2,22 (Cunningham, 1981), 2,24 (Reid *et al.*, 1985) e 3,06 (Bormann & Cunningham, 1997; 1998; Cunningham & Niehus, 1993; Cunningham *et al.*, 1993). Em terceiro, na medida em que ocorre o aumento do índice de formato, ocorre aumento de frequência de NS e, em especial, de ACL. Esses dados indicam que a distribuição de resultados advindos destes aparatos pode diferir daquela apresentada conforme o aumento do comprimento dos aparatos.

De fato, anteriormente foi dito que os aparatos utilizados pelo grupo de Gauvin (Bedingfield *et al.*, 1999; Gauvin *et al.*, 1994; 1997) e por Becker *et al.* (2006) aparentam manter relação com os aparatos do grupo de Cunningham e de Reid. A afirmativa se embasa nas ocorrências acima descritas (largura menor  $< 20$  cm; índices de formato de 2,5 e 4,55 respectivamente; aumento da ocorrência de NS e de ACL conforme aumento do índice de formato). Assim, além da classe de aparatos descrita como propícia ao condicionamento de PCL e das duas propícias a resultados NS em protocolos  $C \leq 10$ , esses aparatos de largura menor que 20 cm aparentam constituir outra classe, mais propícia ao condicionamento de ACL. Reforçando essa afirmativa, quando Fidler *et al.* (2004) aumentaram o número de sessões de condicionamento ou utilizaram fase de pré-exposição ao etanol, todos os 8 resultados reportados foram de ACL. De toda forma, é necessário ressaltar que Fidler *et al.* (2004) utilizaram animais S-D alocados individualmente em seus experimentos e, conforme vem sendo apontado, tanto a alocação individual aumenta as chances de condicionamento de ACL e de obtenção de NS, quanto a linhagem S-D aparenta ter sensibilidade ao etanol diferente da apresentada pela linhagem W (mas ver experimento de pré-exposição de Reid *et al.*, 1985).

A partir dessa exposição podemos estabelecer critérios para a análise estatística. De forma a verificar a validade da interpretação até aqui construída acerca das relações de protocolos curtos de condicionamento com os tipos de aparatos, diferentes organizações de dados de aparatos foram analisadas. Primeiro, foram excluídos (a) os dados de linhagens de uso

pouco frequente, (b) os dados de pré-exposição subcrônica à solução salina provenientes de Bieńkowski *et al.* (1996; E4-E5, E8-E9) e (c) os dados dos aparatos remanescentes foram divididos em 3 categorias mutuamente excludentes: (1) aparatos de largura  $< 20$  cm ( $L < 20$ ); (2) aparatos de comprimento  $< 75$  cm ( $C < 75$ ); (3) aparatos com comprimento  $> 75$  cm ( $C > 75$ ). Em segundo, mantendo as exclusões anteriores, também foram excluídos os dados provenientes de Bieńkowski, Iwinska *et al.* (1997), Bieńkowski, Kuca *et al.* (1997), Quertemont *et al.* (1998), de Quertemont e De Witte (2001) e de Gauvin *et al.* (1997) por conta das diferenças de protocolo de condicionamento apresentadas nestes artigos em relação aos demais. Além disso, por conta das exclusões dos dados de Quertemont *et al.* (1998) e de Quertemont e De Witte (2001), os dados de Gawel *et al.* (2016) também foram excluídos. Por último, mantendo as exclusões anteriores, foram excluídos os dados de Morse *et al.* (2000), de Zarrindast *et al.* (2010) e de Rezayof *et al.* (2012) por conta das diferenças de disposição de câmaras.

No primeiro caso, quando as 3 categorias de aparatos foram comparadas entre si, houve diferença significativa na distribuição dos resultados (teste exato de Fisher = 44,727;  $p < 0,001$ ). Dentro desse mesmo arranjo, outras 3 comparações foram realizadas: (a)  $L < 20$  vs.  $C < 75$  (teste exato de Fisher = 18,802,  $p < 0,001$ ); (b)  $C < 75$  vs.  $C > 75$  (teste exato de Fisher = 34,506,  $p < 0,001$ ); (c)  $L < 20$  vs.  $C > 75$  ( $\chi = 6,058$ ,  $p = 0,022$ ). Esses resultados indicam que as 3 categorias diferem entre si em relação à distribuição de resultados obtidos em protocolos  $C \leq 10$ . Também indicam que aparatos  $L < 20$  e  $C > 75$  só produzem ACL e NS em protocolos curtos de condicionamento, visto a validade de uso de teste de qui-quadrado nesse caso (i.e. uma tabela 2x2:  $L < 20$  vs.  $C > 75$  e NS vs. ACL).

Quando da exclusão dos dados de Bieńkowski, Iwinska *et al.* (1997), Bieńkowski, Kuca *et al.* (1997), Quertemont *et al.* (1998), de Quertemont e De Witte (2001), Gauvin *et al.* (1997) e de Gawel *et al.* (2016), as 3 classes de aparatos diferiram entre si (teste exato de Fisher = 47,206;  $p < 0,001$ ). Ainda nesse arranjo, quando as classes foram analisadas aos pares também houve diferença significativa em todas as comparações ( $L > 20$  vs.  $C < 75$ : teste exato de Fisher: 18,582,  $p < 0,001$ ;  $C < 75$  vs.  $C > 75$ : teste exato de Fisher: 32,363,  $p < 0,001$ ;  $L > 20$  vs.  $C > 75$ :  $\chi$ : 12,363,  $p = 0,001$ ). Esses resultados reforçam as interpretações dos resultados anteriores. Quando da exclusão dos dados de Morse *et al.* (2000), Zarrindast *et al.* (2010) e Rezayof *et al.* (2012), as 3 categorias mantiveram as diferenças (teste exato de Fisher = 40,659,  $p < 0,001$ ).

Quando comparados os pares de categorias<sup>10</sup>, também houve diferenças ( $C < 75$  vs.  $C > 75$ : teste exato de Fisher: 25,744,  $p < 0,001$ ;  $L > 20$  vs.  $C > 75$ :  $\chi$ : 10,363,  $p = 0,002$ ).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que há pelo menos 3 diferentes classes de aparatos sendo utilizadas em MCL com etanol em ratos. Essas classes diferem na probabilidade de produção de NS, ACL e PCL, sendo que somente a classe  $C < 75$  produziu PCL em protocolos  $C \leq 10$  e esse dado estatístico é reforçado pelo fato de que isso ocorre em linhagens heterogênicas albinas (S-D e W) e pigmentada (L) e em animais alocados individualmente e em grupo. De outra feita, as outras duas classes de aparatos ( $L < 20$  e  $C > 75$ ) só produziram resultados NS e ACL, mas diferem na probabilidade de produção de um ou de outro resultado, sendo mais fácil a produção de ACL na classe  $L < 20$ . Nesse último caso, os aparatos  $L < 20$  aparentam ter maior probabilidade de produção de ACL que os aparatos  $C > 75$ , mas essa diferença pode ser resultado da interação dos aparatos  $L < 20$  com a alocação individual, haja visto que na maioria dos usos de aparatos  $L < 20$  os animais foram alocados individualmente. Adicionalmente, a maneira pela qual os resultados de protocolos  $C \leq 10$ ,  $C \geq 12$  e com fase de pré-exposição ao etanol estão distribuídos nos aparatos com câmara de acesso estilo corredor sugerem possibilidade desses aparatos poderem dificultar a obtenção de condicionamento bem-sucedido, tal qual a classe  $C > 75$ . Ainda assim, a baixa diversidade de protocolos  $C \leq 10$  usuais nesses aparatos demanda cautela na interpretação de resultados advindos desse tipo de aparato. Esse ponto é retomado na seção 3.3.

No caso dos dados referentes às modalidades estimulatórias empregadas, houve baixa frequência de uso isolado das modalidades olfativa, tátil e visual em cada categoria de aparato. Em contrapartida, a maioria dos experimentos reportados utilizou combinação das modalidades visual e tátil ao condicionamento. Essa grande diferença de frequência de uso isolado e em combinação impede comparações estatísticas confiáveis. Adicionalmente, há baixa diversidade de critério de escolha de câmara de condicionamento nos aparatos  $C < 75$ , o que poderia nos levar a conclusões erradas caso a distribuição verificada na amostra passasse por escrutínio estatístico. Por conta desses fatores, esses dados não foram submetidos à análise estatística. A seguir, arranjos experimentais, de condicionamento e de teste são analisados, levando-se em conta as diferenças encontradas nessa seção, bem como as encontradas na seção 3.1.1.

---

<sup>10</sup> Em relação à organização anterior, nessa organização não houve modificações nas distribuições de frequências de resultados nas categorias de aparatos  $L < 20$  e  $C < 75$ . Portanto, não faria sentido repetir a comparação  $L < 20$  vs.  $C < 75$ .

### 3.3 ARRANJOS EXPERIMENTAIS, DE CONDICIONAMENTO E DE TESTE

De todas as categorias metodológicas cujos dados foram extraídos, os arranjos experimentais apresentam o maior número de variáveis, de dados reportados e a maior diversidade. Devido à grande quantidade de dados, nessa seção somente os protocolos de MCL foram analisados e a análise foi centrada nas linhagens albinas heterogênicas. Dados referentes à fase de pré-exposição ao etanol e a veículos são apresentados no Apêndice B e dados referentes à fase de exposição continuada são apresentados no Apêndice C.

#### 3.3.1. *Protocolos de MCL*

Protocolos de MCL variaram no número total de fases, na duração das sessões de cada fase, na extensão dos intervalos entre sessões de uma mesma fase e dos intervalos interfásicos, na ordem das sessões de condicionamento, na valência (positiva ou negativa) e na extensão dos intervalos entre estímulos. Outras variações ocorreram com relação à via de administração utilizada (intraperitoneal, intragástrica e intravenosa), bem como na concentração, volume e dose das soluções de etanol administradas. Como uma única tabela reunindo esses dados ficaria demasiadamente extensa, os dados foram organizados em tabelas diferentes, correspondentes aos tipos de aparatos implementados. Conseqüentemente, a análise textual ocorreu particionada, de acordo com cada tabela. Além disso, os dados de alocação individual e grupal não foram utilizados na organização dessas tabelas e são pouco discutidos nessa seção por questões de simplificação de análise. Ainda assim, o leitor deve ter em mente que tais efeitos estão presentes.

A Tabela 1.6 apresenta os dados de protocolos para aparatos da classe  $L < 20$ . O escrutínio da referida tabela sugere que protocolos  $C \leq 10$  resultam em ACL em animais H e S-D quando as doses de etanol estão no intervalo de 1 a 4 g/kg. Como os aparatos  $L < 20$  associados com alocação individual causam viés ao condicionamento de ACL, não é possível discernir se as doses implementadas nesse intervalo são aversivas *per se*, se a aversividade resulta do próprio aparato, da alocação individual ou da interação desses fatores.



**Tabela 1.6.**

Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe L &lt; 20.

Citação	Lin	Protocolo de MCL				Protocolo de administração				Resultados				
		Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, min)	IES (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
<b>Protocolos curtos de condicionamento</b>														
Borman & Cunningham (1997)	H	0-0-8	NA-NA-60-60	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	15	15	1,8	-	E1	-
Borman & Cunningham (1997)	H	0-0-8	NA-NA-60-60	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	15	10	1,2	-	-	E2-E3
Cunningham (1981)	H	0-0-10	NA-NA-15-20	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V	-5	ip	12,6	10	1	-	E1	-
Cunningham (1981)	H	0-0-10	NA-NA-15-20	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V	-5	ip	12,6	20	2	-	E2	-
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	-30	ip	15	8,4	1	-	-	E1
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	-15	ip	15	8,4	1	-	E2	-
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	-10	ip	15	8,4	1	-	-	E3
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	-5	ip	15	8,4	1	-	-	E4
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	15	8,4	1	-	E5	-
Borman & Cunningham (1998)	H	1-0-8	5-NA-5-60	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	5	ip	15	8,4	1	-	-	E6
Cunningham & Niehus (1993)	H	1-0-8	60-NA-60-60	NA-NA-24 e 72	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	NR	NR	1,2	-	E1-E2	E3
Cunningham & Niehus (1993)	H	1-0-8	60-NA-60-60	NA-NA-24 e 72	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	NR	NR	1,8	-	E4-E5	E6
Cunningham <i>et al.</i> (1993)	H	1-0-8	30-NA-5-30	NA-NA-24 e 72	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	19	10	1,5	-	E1	-
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	1-1-4	10-10-4-10	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-4	ip	0,1	10	1	-	E2	-
Marglin <i>et al.</i> (1988)	S-D	1-1-12	20-40-15-40	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-E-E-V; V-E-E-E	0	ip	6,4	10	0,5	-	-	E1
Bedingfield <i>et al.</i> (1999)	S-D	3-1-4	20-20-20-20	24-NA-24 e 48	24; NA; 24; 24	V-E-ST (x2)	0	ig	12,7	15	1,5	-	-	E1
Bedingfield <i>et al.</i> (1999)	S-D	3-1-4	20-20-20-20	24-NA-24 e 48	24; NA; 24; 24	V-E-ST (x2)	0	ig	12,7	22,57	2,25	-	-	E2
Gauvin <i>et al.</i> (1997)	S-D	4-1-4	30-30-NR-30	24-NA-48	24; NA; NR; 24	E-V	-1080	NR	12,7	40	4	-	-	E1-E2
Gauvin <i>et al.</i> (1997)	S-D	4-1-4	30-30-NR-30	24-NA-144	24; NA; NR; 24	E-V	-1080	NR	12,7	40	4	-	-	E3-E4
Gauvin <i>et al.</i> (1994)	S-D	[4]-1-8	60-30-60-30	NR-NA-NR	24; NA; NR; 24	E-ST-V (x4)	0	ig	25,5	20	4	-	E1	-
Becker <i>et al.</i> (2006)	W (S)	1-1-4	30-30-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	6,4	10	0,5	-	-	E1
Becker <i>et al.</i> (2006)	W (S)	1-1-4	30-30-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	25,5	10	2	-	E2	-
<b>Protocolos longos de condicionamento</b>														
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	2-0-14	15-NA-60-60	24-NA-24 e 48	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	iig	10	8,75	0,7	-	E1, E3	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	2-0-14	15-NA-60-60	24-NA-24 e 48	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	iig	10	18,75	1,5	-	E2, E4	-
<b>Protocolos de MCL com fase de pré-exposição ao etanol</b>														
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	0-0-12	NA-NA-15-60	NA-NA-24 e 48	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	iig	10	12,7	1	-	E7	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	0-0-12	NA-NA-15-60	NA-NA-24 e 48	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	-10	iig	10	12,7	1	-	E8	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	2-0-14	15-NA-60-60	24-NA-24 e 48	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	iig	10	8,75	0,7	-	E5	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	S-D	2-0-14	15-NA-60-60	24-NA-24 e 48	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	iig	10	18,75	1,5	-	E6	-
Reid <i>et al.</i> (1985)	S-D	1-1-8	10-10-4-10	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-4	ip	10	10	1	E1	-	-

**Nota:** Com exceção de Cunningham (1981), em todos os experimentos do grupo de Cunningham nos quais há presença de fase de habituação os animais só foram habituados aos aparatos de condicionamento e não aos estímulos táteis empregados como estímulos condicionais. Em Marglin *et al.* (1988), as fases de linha de base e de teste tiveram duração de 40 minutos, mas na contabilização de dados esses experimentadores só utilizaram os 30 minutos iniciais das mesmas.

**Lin**, linhagem de *Rattus norvegicus*; **Nº S (H-LB-C)**, número de sessões de habituação, linha de base e condicionamento; **DS (H-LB-C-T, min)**, duração (em minutos) das sessões de habituação, linha de base, condicionamento e teste; **IES (H-LB-C, h)**, intervalo (em horas) entre as sessões de habituação, entre as sessões de linha de base e entre as sessões de condicionamento; **IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)**, intervalo interfásico (em horas) habituação-linha de base, habituação-condicionamento, linha de base-condicionamento, e condicionamento-teste; **OSC**, ordem das sessões de condicionamento; **IEE**, intervalo entre estímulos; **Via**, via de administração; **Conc**, concentração da solução de etanol administrada; **Vol**, volume da solução de etanol administrada; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo/falha de condicionamento; **H**, linhagem Holtzman; **S-D**, linhagem Sprague-Dawley; **W (S)**, linhagem Wistar (shoe); **NA**, não se aplica; **NR**, não relatado; **E**, solução de etanol; **V**, veículo da solução de etanol; **ST**, sem tratamento; **ip**, via de administração intraperitoneal (injeção); **ig**, via de administração intragástrica (gavagem); **iig**, via de administração intragástrica (intubação); **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.

O exame da Tabela 1.6 também sugere que há interação das doses com o número de sessões de habituação, de linha de base e de condicionamento. Nos 2 primeiros casos, o aumento do número de sessões parece diminuir a probabilidade de condicionamento bem-sucedido quando doses nesse intervalo são utilizadas. Essa influência pode estar relacionada com o fenômeno de inibição latente (Lubow, 1965; Lubow & Moore, 1959): quando estímulos a serem condicionados são apresentados de maneira não reforçada (i.e., sem a apresentação do estímulo incondicional), o número de sessões necessárias à ocorrência do condicionamento aumenta. Como sessões de habituação e de linha de base constituem apresentações não reforçadas dos estímulos a serem condicionados, há grande possibilidade de ocorrência de inibição latente sobre o condicionamento. Todavia, é necessário enfatizar que a habituação utilizada pelo grupo de Cunningham se refere à exposição dos animais ao aparato, sem a presença dos estímulos a serem condicionados. Os possíveis efeitos da inibição latente nesse caso não parecem ser relevantes.

No caso do aumento do número de sessões de condicionamento, esse fator é descrito na literatura de condicionamento pavloviano (Pavlov, 1927) e, como foi visto em seções anteriores, no MCL com etanol em ratos, aumenta a probabilidade de condicionamento bem-sucedido. É interessante notar que a extensão do histórico de contato com etanol (protocolos de pré-exposição ao etanol) também parece diminuir os efeitos de inibição latente, da mesma forma que protocolos  $C \geq 12$ . Além disso, ambos os procedimentos parecem aumentar (no limite inferior) o intervalo de doses que geram condicionamento, mesmo quando via intragástrica é implementada (Fidler *et al.*, 2004). Por outro lado, a extensão do histórico de contato com etanol aparenta modificar a valência (i.e., ACL ou PCL) do condicionamento em aparatos  $L < 20$  quando a largura desses aparatos está mais próxima de 20 cm (Reid *et al.*, 1985).

Adicionalmente, o intervalo entre estímulos empregado também parece influenciar a probabilidade de condicionamento bem-sucedido. Esse fator também é descrito na literatura de condicionamento pavloviano (Gormezano & Kehoe, 1981), mas parece funcionar de forma diferente no MCL com etanol da relatada em condicionamento com estímulos incondicionais (US) típicos (i.e., estímulos incondicionais que não sejam fármacos). Por exemplo, na literatura de condicionamento pavloviano com US típicos, diminuição da probabilidade de condicionamento é relatada quando o intervalo entre as apresentações dos estímulos é de valor zero, negativo ou ainda quando o valor positivo é muito alto (na maioria dos casos, acima de 60 segundos).

Entretanto nota-se que intervalos de valor zero e negativos próximos de 5 min parecem aumentar a probabilidade de condicionamento bem-sucedido no MCL e a extensão do histórico

de contato parece aumentar o intervalo no limite inferior: condicionamento bem-sucedido é reportado com intervalo de -10 min (Fidler *et al.*, 2004; mas ver o intervalo de -15 min relatado por Borman & Cunningham, 1998). Assim sendo, esses dados parecem ter relação com os dados de Garcia e associados (Garcia & Koelling, 1966; Garcia, Ervin & Koelling, 1966) acerca do extenso intervalo entre estímulos que gera condicionamento com xenobióticos. Também indica que os efeitos pós-administração do etanol parecem ter maior relevância ao MCL em protocolos  $C \leq 10$  sem fase de pré-exposição. Nesse tópico, não é clara a relação da duração das sessões de condicionamento com os efeitos pós-administração do etanol.

No caso dos aparatos da classe  $C < 75$ , a Tabela 1.7 dispõe os dados. Visto que esses aparatos são melhores ao condicionamento de PCL que os demais aparatos, esses dados podem ser usados na estimativa dos intervalos de doses nos quais condicionamento bem-sucedido ocorre em protocolos  $C \leq 10$ . Os dados de Barbier *et al.* (2008), Morales *et al.* (2012), Alaux-Cantin *et al.* (2013) e Zuo *et al.* (2017) apontam que o intervalo de doses está entre 0,5 e 2 g/kg para animais da linhagem S-D<sup>11</sup>. Na medida em que se aumenta ou diminui o número de sessões de habituação, de linha de base e de condicionamento, bem como o intervalo entre estímulos, o efeito da dose administrada parece variar. Por exemplo, Morales *et al.* (2012) reportaram condicionamento bem-sucedido (PCL) em 3 experimentos sem fases de habituação e de linha de base com 4 sessões de condicionamento, utilizando dose de 1,5g/kg e intervalo entre estímulos de zero. Quando uma sessão de habituação foi realizada no quarto experimento, mantendo demais variáveis nos mesmos parâmetros, este resultou em NS.

---

<sup>11</sup> No que diz respeito aos 2 condicionamentos de ACL induzidos por dose de 0,25 g/kg reportados por Zuo *et al.* (2017), pelo menos 3 possibilidades explicativas existem: (a) o intervalo de dose para ratos S-D em aparatos  $C < 75$  vai de 0,25 a 2 g/kg; (b) Os animais S-D utilizados por Zuo *et al.* (2017) apresentam maior sensibilidade ao etanol por questões de variação intralinhagem (Kacew & Festing, 1999); (c) a reportagem ilustra caso de falso condicionamento. Nesse trabalho, a última interpretação é favorecida.

**Tabela 1.7.**

Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe C &lt; 75.

Citação	Lin	Protocolo de MCL						Protocolo de administração				Resultados		
		Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, mim)	IS (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
<b>Protocolos curtos de condicionamento</b>														
Morales <i>et al.</i> (2012)	S-D	0-0-4	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	12,6	15	1,5	E1-E3	-	-
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA 24	E-V; V-E	0	ip	15	12,7	1,5	-	E1	-
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	0-1-8	NA-15-15-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	V-E	0	ip	12,5	2,5	0,25	-	E1, E5	-
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	0-1-8	NA-15-15-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	V-E	0	ip	12,5	5	0,5	-	-	E2
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	0-1-8	NA-15-15-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	V-E	0	ip	12,5	10	1	-	-	E3
Zuo <i>et al.</i> (2017)	S-D	0-1-8	NA-15-15-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	V-E	0	ip	12,5	20	2	E4, E6	-	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-10	ip	20	3,2	0,5	E1	-	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-10	ip	20	9,5	1,5	E3	-	-
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	3,2	0,5	-	-	E1
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	6,4	1	E3	-	-
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	17,7	2	-	-	E5
Morales <i>et al.</i> (2012)	S-D	1-0-4	15-NA-30-15	NA-NA-24	NA; 24; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	12,6	15	1,5	-	-	E4
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2-1-6	15-15-50-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	0,5	0,075	-	-	E1, E6
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2-1-6	15-15-50-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	1	0,15	-	-	E2, E7
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2-1-6	15-15-50-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	1,9	0,3	-	-	E3, E8, E10
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2-1-6	15-15-50-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	3,8	0,6	-	-	E4, E9
Ise <i>et al.</i> (2013)	S-D	2-1-6	15-15-50-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	7,6	1,2	-	-	E5
Patkina & Zvartau (1998)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-2 e 24	NA; NA; NA; 72	V-E	-1,5	ig	50	3	1,2	E1	-	-
Bagrov <i>et al.</i> (1999)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-2 e 24	NA; NA; NA; 72	V-E	-2	ig	50	3	1,2	E1	-	-
Bahi (2013)	W	0-1-8	NA-15-20-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 240; 24	E-V; V-E	0	ip	20	3,2	0,5	-	-	E1, E3
Bahi (2013)	W	0-1-8	NA-15-20-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 240; 24	E-V; V-E	0	ip	20	6,4	1	E2, E4	-	-
Bahi & Dreyer (2013)	W	0-1-10	NA-15-30-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 192; 24	E-V	0	ip	20	3,2	0,5	E1	-	-
Bahi & Dreyer (2014)	W	0-1-10	NA-15-30-15	NA-NA-4 e 24	NA; NA; 192; 24	E-V; V-E	0	ip	20	3,2	0,5	E1	-	-
Al Ameri <i>et al.</i> (2014)	W	0-1-10	NA-30-30-30	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	[V-E]	0	ip	10	6,9	0,5	E1	-	-
Cole <i>et al.</i> (2003)	L	2-1-4	15-15-15-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	3,2	0,5	-	-	E1
Cole <i>et al.</i> (2003)	L	2-1-4	15-15-15-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	6,4	1	-	-	E2
Cole <i>et al.</i> (2003)	L	2-1-4	15-15-15-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	20	12,7	2	E3-E4	-	-
Schechter (1991)	P e NP	2-1-6	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	V-E	-10	ip	NR	NR	1	-	E1-E2	-
<b>Protocolos longos de condicionamento</b>														
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	2-1-14	30-30-20-30	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	5	0,5	E1-E2	-	-
Zhu <i>et al.</i> (2007)	W	2-1-14	30-30-20-30	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	5	0,5	E4-E6	-	-

Citação	Lin	Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, min)	IS (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
Bie <i>et al.</i> (2009)	W	2-1-14	30-30-20-30	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	5	0,5	E1-E5	-	-
Bozarth (1990)	L-E	4-1-15	15-15-30-15	24-NA-24 e 72	24; NA; 72; 72	E-E-E-E-E- ST-ST	0	ip	NR	NR	0,5	-	-	E1
Bozarth (1990)	L-E	4-1-15	15-15-30-15	24-NA-24 e 72	24; NA; 72; 72	E-E-E-E-E- ST-ST	0	ip	NR	NR	1	E2	-	-
<b>Protocolos de MCL com fase de pré-exposição ao etanol</b>														
Busse <i>et al.</i> (2005)	S-D	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	15	12,7	1,5	-	E2	-
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	3,2	0,5	-	-	E2
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	6,4	1	E4	-	-
Barbier <i>et al.</i> (2008)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	20	17,7	2	-	-	E6
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-10	ip	20	3,2	0,5	-	-	E2
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	S-D	0-1-8	NA-20-20-20	NA-NA-5 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-10	ip	20	9,5	1,5	-	-	E4
Sable <i>et al.</i> (2004)	S-D	0-1-4	NA-15-15-15	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	10	12,7	1	-	-	E1
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	iig	10	4,5	0,35	-	-	E1, E5
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	iig	10	8,9	0,7	E2, E6	-	-
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	iig	10	19,1	1,5	E3	-	E7
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	iig	10	35,7	2,8	-	-	E4
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ig	10	4,5	0,35	-	-	E8
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ig	10	8,9	0,7	-	-	E9
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ig	10	19,1	1,5	-	-	E10
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	4,5	0,35	-	-	E11
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	8,9	0,7	-	-	E12, E14
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	19,1	1,5	-	-	E13
Ciccocioppo, Panocka, Polidori <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-10	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	iig	10	8,9	0,7	E1	-	-
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-20	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	8,9	0,7	-	-	E15
Ciccocioppo, Panocka, Froldi <i>et al.</i> (1999)	msP	1-1-30	15-15-60-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	8,9	0,7	-	-	E16

**Nota:** Zhu *et al.* (2007) reportaram um experimento (E3) com sessão única de condicionamento que resultou em falha de condicionamento. Como o dado desse experimento não modifica a análise realizada, o mesmo não foi incluído na tabela.

**Lin**, linhagem de *Rattus norvegicus*; **Nº S (H-LB-C)**, número de sessões de habituação, linha de base e de condicionamento; **DS (H-LB-C-T, min)**, duração (em minutos) das sessões de habituação, linha de base, condicionamento e teste; **IES (H-LB-C, h)**, intervalo (em horas) entre as sessões de habituação, entre as sessões de linha de base e entre as sessões de condicionamento; **IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)**, intervalo interfásico (em horas) habituação-linha de base, habituação-condicionamento, linha de base-condicionamento, e condicionamento-teste; **OSC**, ordem das sessões de condicionamento; **IEE**, intervalo entre estímulos; **Via**, via de administração; **Conc**, concentração da solução de etanol administrada; **Vol**, volume da solução de etanol administrada; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo/falha de condicionamento; **H**, linhagem Holtzman; **S-D**, linhagem Sprague-Dawley; **W (S)**, linhagem Wistar (shoe); **NA**, não se aplica; **NR**, não relatado; **E**, solução de etanol; **V**, veículo da solução de etanol; **□**, dado de identificação duvidosa; **ST**, sem tratamento; **ip**, via de administração intraperitoneal (injeção); **ig**, via de administração intragástrica (gavagem); **iig**, via de administração intragástrica (intubação); **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.

Por outro lado, Zuo *et al.* (2017) reportou falha de condicionamento na dose de 1 g/kg, empregando protocolo de MCL com uma sessão de linha de base, 8 sessões de condicionamento e intervalo entre estímulos de zero; nesse mesmo arranjo, reportou PCL somente quando dose de 2g/kg foi implementada. Em contrapartida, Alaux-Cantin *et al.* (2013) utilizando protocolo de MCL similar ao de Zuo *et al.* (2017), mas com sessões de diferentes durações e intervalo entre estímulos de -10 min, reportou PCL nas doses de 0,5 e de 1,5 g/kg, enquanto que Barbier *et al.* (2008) só reportou PCL na dose de 1 g/kg.

Posto isso, na medida em que se aumenta o número de sessões de habituação e de linha de base, diminuem as chances de condicionamento bem-sucedido em protocolos  $C \leq 10$  em aparatos da classe  $C < 75$ , tal qual foi visto para a classe  $L < 20$ . Esse efeito deletério da inibição latente aparenta ser a explicação mais plausível às falhas de condicionamento reportadas por Ise *et al.* (2013). Visto que esses experimentadores utilizaram duas sessões de habituação e uma sessão de linha de base, associadas com apenas 6 sessões de condicionamento, não são de todo inesperadas as falhas reportadas quando empregaram as doses 0,6 e 1,2 g/kg, as quais estão dentro do intervalo acima referido. De outra maneira, a falha de condicionamento relatada por Busse *et al.* (2005), empregando dose de 1,5 g/kg, pode ser melhor entendida segundo interações entre o sistema de alocação com o horário de condicionamento (em relação com o ciclo claro-escuro no qual os animais se encontram alojados). Esse possível efeito do horário é examinado no Capítulo 2.

Ainda nesse tópico, é importante destacar que os dados de Morales *et al.* (2012) indicam a possibilidade de condicionamento de PCL com somente 4 sessões de condicionamento em animais alocados em grupo. Esses dados vão de encontro à opinião predominante na literatura de MCL de que o etanol só causa PCL quando há emprego de muitas sessões de condicionamento (Bozarth, 1990; Melis *et al.*, 2007; Peana *et al.*, 2008; Swerdlow *et al.*, 1990; Zhu, 2007) ou quando há histórico de contato com o etanol previamente ao condicionamento (Bieńkowski *et al.*, 1995; 1996; Swerdlow *et al.*, 1990). Diferentemente dessa opinião, a análise realizada indica que o número de sessões de condicionamento necessário ao estabelecimento de PCL será determinado por interações entre (a) o sistema de alocação, (b) as classes de aparatos, (c) as doses de etanol administradas (de acordo com a via) e (d) o número de sessões de habituação e de linha de base.

Também é importante ressaltar que os dados de Barbier *et al.* (2008), Alaux-Cantin *et al.* (2013) e Zuo *et al.* (2017) apontam para possíveis efeitos da duração das sessões de habituação, linha de base e condicionamento, bem como dos intervalos entre as sessões de uma fase e dos intervalos interfásicos. Porém a variação na duração dos testes dificulta a comparação

dos resultados obtidos, já que testes com maiores durações apresentam maior oportunidade de resposta aos animais que testes de durações menores. Assim, efeitos advindos de diferentes oportunidades de resposta no teste não podem ser discernidos de efeitos provenientes dos procedimentos de habituação, de linha de base e de condicionamento. Esse assunto é examinado no capítulo 2.

Em relação aos dados da linhagem W em protocolos  $C \leq 10$ , esses sugerem que o intervalo de doses no qual ocorre PCL difere em extensão do verificado para animais S-D. Animais W parecem ser responsivos ao intervalo de doses de 0,5 a 1,0 g/kg quando a via de administração é intraperitoneal. Pequena variação pode ser notada para a via de administração intragástrica (dose de 1,2 g/kg). Como as concentrações sanguíneas e encefálicas de etanol para a mesma dose diferem de acordo com uma ou outra dessas vias (Livy, Parnell, & West, 2003; Nurmi, Kiianmaa, & Sinclair, 1994; Walker & Ehlers, 2009), sendo maior para a via intraperitoneal, é possível que o intervalo para via intragástrica esteja entre 1,0 e 1,5 g/kg no MCL com etanol para animais alocados em grupo.

De outra maneira, os dados de Bahi (2013) e Bahi e Dreyer (2013; 2014) sugerem que o aumento do intervalo entre a linha de base e o condicionamento (240 h em Bahi, 2013; 192 h em Bahi e Dreyer, 2013; 2014) diminui os efeitos deletérios da inibição latente sobre a efetividade do condicionamento. Assim, tanto o aumento do número de sessões de condicionamento, quanto o aumento do intervalo interfásico linha de base-condicionamento ou habituação-condicionamento poderiam ser utilizados para diminuir tais efeitos da inibição latente. Dado que a primeira possibilidade parece estar bem estabelecida na literatura, a segunda possibilidade é verificada no capítulo 2.

No que diz respeito aos protocolos  $C \geq 12$ , experimentos foram relatados para as linhagens L-E e W. No caso de animais W, Zhu *et al.* (2007) e Bie *et al.* (2009) relataram estabelecimento de PCL em 10 experimentos utilizando a dose de 0,5 g/kg. Apesar de experimentos com doses maiores que 0,5 g/kg não terem sido realizados, esses dados podem indicar que doses dentro do intervalo acima referido para a linhagem W continuam a ser funcionais em protocolos longos de condicionamento nos aparatos  $C < 75$ . Por outro lado, no caso de protocolos com fase de pré-exposição ao etanol, experimentos foram relatados para as linhagens S-D e msP. Nos experimentos para a linhagem S-D, somente Barbier *et al.* (2008) e Busse *et al.* (2005) relataram experimentos com condicionamento bem-sucedido (PCL no primeiro e ACL no segundo caso) utilizando doses de 1,0 e 1,5 g/kg, respectivamente. Demais experimentos de Barbier *et al.* (2008) e de Alaux-Cantin *et al.* (2013), com doses de 0,5, 1,5 e

2,0 g/kg, resultaram em falha de condicionamento. Não é clara a maneira pela qual esses dados podem ser interpretados.

Importante ressaltar que tanto Barbier *et al.* (2008) quanto Reid *et al.* (1985) relataram PCL em protocolos com fase de pré-exposição ao etanol quando a dose implementada foi de 1 g/kg. Visto que Reid *et al.* (1985) utilizou aparato com largura de 19 cm, esses dados podem apontar tanto a transição entre as classes  $L < 20$  e  $C < 75$ , como o intervalo de dose ao qual animais S-D são responsivos em protocolos com fase de pré-exposição. Ademais, Sable *et al.* (2004) relataram falha de condicionamento utilizando a mesma dose que Barbier *et al.* (2008) e Reid *et al.* (1985). Todavia Sable *et al.* (2004) implementaram protocolo de condicionamento com 4 sessões de condicionamento, associado com uma sessão de linha de base, enquanto que nos outros casos, protocolo com 8 sessões de condicionamento foi implementado, associado com somente uma sessão de linha de base (Barbier *et al.*, 2008) e com sessão de habituação e de linha de base (Reid *et al.*, 1985). Esses dados indicam a existência de interação entre inibição latente e número de sessões de condicionamento em protocolos com fase de pré-exposição ao etanol.

No referente aos aparatos  $C > 75$ , a Tabela 1.8 dispõe os dados extraídos. Como pode ser visto, aparatos  $C > 75$  apresentam o maior número de experimentos reportados na literatura, a maior variação de doses de etanol utilizadas, bem como de vias de administração. Em protocolos curtos de condicionamento com ratos S-D, 3 grupos de pesquisa reportaram experimentos com 8 sessões de condicionamento associadas com nenhuma sessão de habituação (Busse & Riley; 2002; Busse *et al.*, 2004), uma sessão de habituação (Yu *et al.*, 2016), duas sessões de habituação e uma de linha de base (Asin *et al.*, 1985). Nesses casos, doses dentro do intervalo anteriormente estabelecido para a linhagem S-D foram empregadas (de 0,5 a 2 g/kg por via intraperitoneal), mas só foram reportadas falhas de condicionamento.



**Tabela 1.8.**

Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em aparatos da classe C &gt; 75.

Citação	Lin	Protocolo de MCL					Protocolo de administração					Resultados		
		Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, min)	IS (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
<b>Protocolos curtos de condicionamento</b>														
Busse & Riley (2002)	S-D	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	[15]	NR	0,5	-	-	E1
Busse & Riley (2002)	S-D	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	[15]	NR	1,5	-	-	E2
Busse <i>et al.</i> (2004)	S-D	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	15	3,2	0,5	-	-	E1-E2
Yu <i>et al.</i> (2016)	S-D	0-1-8	NA-15-20-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	25,5	10	2	-	-	E1
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[6]	NR	0,05	-	-	E1
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[6]	NR	0,1	-	-	E2
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[12]	NR	0,15	-	-	E3
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[12]	NR	0,3	-	-	E4
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[12]	NR	0,6	-	-	E5
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[12]	NR	0,8	-	-	E6
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	[12]	NR	1	-	-	E7
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	iiiv	0,698	0,28	0,001	-	-	E8
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	iiiv	0,698	0,28	0,002	-	-	E9
Asin <i>et al.</i> (1985)	S-D	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	iiiv	0,698	0,28	0,008	-	-	E10
Stewart & Grupp (1981)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	V-E	0	ip	3,2	10	0,25	-	-	E1
Stewart & Grupp (1981)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	V-E	0	ip	6,3	10	0,5	-	-	E2
Stewart & Grupp (1981)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	V-E	0	ip	12,7	10	1	-	E3	-
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	2,2	10	0,175	-	-	E1
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	3,2	10	0,25	-	-	E2
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	4,5	10	0,35	-	-	E3
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	6,3	10	0,5	-	-	E4
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	9	10	0,7	-	-	E5
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	12,7	10	1	-	E6	-
Stewart & Grupp (1985)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	0	ip	17,8	10	1,4	-	E7	-
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	5	1,4	0,055	-	-	E1
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	5	2,5	0,1	-	-	E2
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	5	4,6	0,18	-	-	E3
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	20	0,6	0,1	-	-	E4
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	20	1,1	0,18	-	-	E5
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	20	2	0,32	-	-	E6
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	20	3,8	0,6	-	-	E7
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	20	7	1,1	-	E8	-
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	50	0,8	0,3	-	-	E9
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	50	1,5	0,6	-	-	E10
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiiv	50	2	0,8	-	-	E11

Citação	Lin	Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, min)	IS (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iiv	50	2,8	1,1	-	E12	-
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	10	6,9	0,5	-	-	E13
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	10	19	1,5	-	-	E14
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	20	3,2	0,5	-	-	E15
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	20	9,5	1,5	-	E16	-
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	50	1,3	0,5	-	-	E17
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	50	2,5	1	-	-	E18
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	50	8,9	3,5	-	E19	-
Van der Kooy <i>et al.</i> (1983)	W	0-0-8	NA-NA-30-15	NA-NA-8 e 24	NA; NA; NA; 24	E-V; V-E	2	iig	50	12,7	5	-	E20	-
Bieńkowski, Kuca <i>et al.</i> (1997)	W	0-1-4	NA-10-30-10	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	12,7	15	1,5	-	E1	-
Bieńkowski, Iwinska <i>et al.</i> (1997)	W	0-1-8	NA-10-30-10	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	10	19	1,5	-	E1	-
Martijena <i>et al.</i> (2001)	W	0-1-8	NA-10-8-10	NA-NA-24 e 168	NA; NA; 20; 28	E-V; V-E	0	ip	12	10	1	-	-	E1
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	1-1-10	10-10-20-10	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-5	ip	10	6,4	0,5	E8	-	E1, E4
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	1-1-10	10-10-20-10	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-5	ip	10	12,7	1	-	-	E2-E3, E5, E9
<b>Protocolos longos</b>														
Melis <i>et al.</i> (2007)	W	0-1-15	NA-30-30-30	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ig	20	6,4	1	E1	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	0-1-15	NA-30-30-30	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ig	20	3,2	0,5	-	-	E1, E5
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	0-1-15	NA-30-30-30	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ig	20	6,4	1	E2, E4	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	0-1-15	NA-30-30-30	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ig	20	6,4	1	E6-E7	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	W	0-1-15	NA-30-30-30	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ig	20	12,7	2	-	-	E3
López & Cantora (2010)	W	1-1-15	15-15-30-15	NA-NA-24 e 72	24; NA; NR; 72	E-E-E-E-E-ST-ST	0	ip	15	8,4	1	E1	-	-
<b>Protocolos de MCL com fase de pré-exposição ao etanol</b>														
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	1-1-10	10-10-20-10	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-5	ip	10	6,4	0,5	E6	-	-
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	W	1-1-10	10-10-20-10	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V; V-E	-5	ip	10	12,7	1	-	-	E7
Bieńkowski <i>et al.</i> (1995)	W	2-1-8	10-10-20-NR	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	10	6,5	0,5	E1	-	-
Bieńkowski <i>et al.</i> (1995)	W	2-1-8	10-10-20-NR	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	10	13	1	-	-	E2
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	25	2,5	0,5	-	-	E1-E4
Pascual <i>et al.</i> (2012)	W	2-1-8	15-15-30-15	24-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	25	5	1	-	E5-E8	-

**Nota:** **Lin**, linhagem de *Rattus norvegicus*; **Nº S (H-LB-C)**, número de sessões de habituação, linha de base e condicionamento; **DS (H-LB-C-T, min)**, duração (em minutos) das sessões de habituação, linha de base, condicionamento e teste; **IES (H-LB-C, h)**, intervalo (em horas) entre as sessões de habituação, entre as sessões de linha de base e entre as sessões de condicionamento; **IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)**, intervalo interfásico (em horas) habituação-linha de base, habituação-condicionamento, linha de base-condicionamento, e condicionamento-teste; **OSC**, ordem das sessões de condicionamento; **IEE**, intervalo entre estímulos; **Via**, via de administração; **Conc**, concentração da solução de etanol administrada; **Vol**, volume da solução de etanol administrada; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo/falha de condicionamento; **S-D**, linhagem Sprague-Dawley; **W**, linhagem Wistar; **L-E**, linhagem Long-Evans; **NA**, não se aplica; **NR**, não relatado; **E**, solução de etanol; **V**, veículo da solução de etanol; **[ ]**, dado de identificação duvidosa; **ST**, sem tratamento; **ip**, via de administração intraperitoneal (injeção); **ig**, via de administração intragástrica (gavagem); **iiv**, via de administração intravenosa (intubação); **iig**, via de administração intragástrica (intubação); **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.

Em contrapartida, Stewart e Grupp (1981; 1985) reportaram 5 experimentos para a linhagem W com administração por via intraperitoneal cujas doses estão dentro do intervalo estabelecido para animais da linhagem W (doses de 0,5, 0,7 e 1,0 g/kg). Curiosamente, falhas de condicionamento foram reportadas para as doses de 0,5 e de 0,7 g/kg e condicionamentos de ACL foram reportados para a dose de 1g/kg, o limite superior do intervalo, e para a dose de 1,4 g/kg. Em concordância com o dado de Stewart e Grupp (1985) para a dose de 1,4 g/kg, Bieńkowski, Iwinska *et al.* (1997) e Bieńkowski, Kuka *et al.* (1997) reportam condicionamento de ACL em 2 experimentos com dose de 1,5 g/kg administrada intraperitonealmente. Esses dados podem indicar que somente doses de 1 g/kg ou maiores são funcionais em aparatos  $C > 75$  em protocolos  $C \leq 10$  e, nesse caso, tendem a produzir ACL. Adicionalmente, em concordância com a análise realizada acerca da inibição latente, Martijena *et al.* (2001) e Bieńkowski *et al.* (1996) reportaram falha de condicionamento na dose de 1 g/kg: os protocolos utilizados nesses casos possuem fase de linha de base (Martijena *et al.*, 2001) e fases de habituação e de linha de base (Bieńkowski *et al.*, 1996), enquanto que os protocolos de Stewart e Grupp (1981; 1985) não possuem essas fases.

De maneira complementar, van der Kooy *et al.* (1983) reportaram experimentos com administração intragástrica utilizando a dose de 1,5 g/kg, os quais dão indício de interação entre a concentração da dose e a via de administração implementadas. Quando a concentração foi de 10% (v/v), o experimento resultou em falha de condicionamento; quando a concentração foi de 20% (v/v), condicionamento de ACL foi reportado. Na via intragástrica, doses de etanol maiores que 1 g/kg em concentrações maiores que 20% (v/v) diminuem os movimentos peristálticos esofágicos e intestinais, diminuem o esvaziamento gástrico e causam o mal funcionamento das cárdias estomacais (Bode, 1980). Assim, é possível que a concentração de 20% esteja aumentando o tempo de permanência e de contato do etanol no estomago e com os intestinos dos animais, aumentando a probabilidade de lesões estomacais e intestinais, o que seria aversivo ao animal (Bode, 1980).

Em protocolos  $C \geq 12$ , a via intragástrica foi usada na maioria dos experimentos reportados, com condicionamento de PCL ocorrendo na dose de 1,0 g/kg, mas não nas doses de 0,5 e de 2,0 g/kg (Melis *et al.*, 2007; Peana *et al.*, 2008). López e Cantora (2010) reportaram condicionamento de PCL na dose de 1,0 g/kg administrada intraperitonealmente. Já em protocolos com fase de pré-exposição ao etanol, estabelecimentos de PCL com uso de via intraperitoneal só foram reportados para a dose de 0,5 g/kg, mas não para a dose de 1 g/kg. Essa discrepância de funcionalidade entre as doses em protocolos  $C \geq 12$  e em protocolos com fase de pré-exposição apontam à possibilidade de que efeitos diferentes do etanol estejam levando

ao condicionamento de PCL num ou noutro protocolo. Todavia, a baixa frequência de uso de via intraperitoneal em protocolos longos de condicionamento em aparatos C > 75 torna essa interpretação questionável.

Por outro lado, é provável que resultados de PCL obtidos por Bieńkowski e associados (1995, E1; 1996, E6) sejam derivados de efeitos ansiolíticos da dose de 0,5 g/kg. Essa afirmativa decorre de: (a) Bieńkowski *et al.* (1996) terem reportado condicionamento de PCL em animais pré-expostos a 20 administrações intraperitoneais de solução salina e condicionados com dose de 0,5 g/kg de etanol (experimento E8; o resultado do experimento E4 aproximou o critério de significância), mas não para a dose de 1 g/kg (experimento E5); (b) que esse dado conota interação entre estresse e efeito ansiolítico da dose de etanol; (c) que Pascual *et al.* (2012) reportaram 4 falhas de condicionamento com a dose de 0,5 g/kg empregando procedimento de pré-exposição ao etanol diferente daquele utilizado por Bieńkowski *et al.* (1995; 1996)<sup>12</sup>, mas protocolo de condicionamento similar ao de Bieńkowski *et al.* (1995). Além disso, frente às falhas de condicionamento com a dose de 1 g/kg em protocolo com fase de pré-exposição reportadas por Bieńkowski *et al.* (1995; 1996), as 3 reportagens de ACL realizadas por Pascual *et al.* (2012) para a dose de 1 g/kg sugere que essa dose interage diferencialmente com o protocolo de pré-exposição utilizado.

Em relação aos aparatos (a) com câmara de estilo corredor, (b) com disposição radial das câmaras de condicionamento e (c) com disposição lateral da câmara de acesso, a Tabela 1.9 apresenta os dados.

---

<sup>12</sup> Durante a fase de pré-exposição, Pascual *et al.* (2012) realizaram 8 administrações intraperitoneais de dose de 3 g/kg, com intervalos de 24 e de 48 h entre as administrações e com intervalo interfásico pré-exposição-habituação de 360 h. Bieńkowski *et al.* (1995; 1996) realizaram 20 administrações intraperitoneais de dose de 0,5 g/kg, espaçadas por intervalo de 24 h e com intervalo interfásico pré-exposição-habituação de 24 h.

**Tabela 1.9.**

Dados dos protocolos de MCL e dos protocolos de administração associados em outros aparatos.

Citação	Lin	Protocolo de MCL				Protocolo de administração				Resultados				
		Nº S (H-LB-C)	DS (H-LB-C-T, min)	IS (H-LB-C, h)	IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)	OSC	IEE (min)	Via	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	PCL	ACL	NS
<b>Protocolos curtos de condicionamento em aparatos com câmara de acesso estilo corredor</b>														
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	1-1-8	15-15-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	2	0,5	-	-	E1
Quertemont <i>et al.</i> (1998)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	NR	NR	0,3	-	-	E1 -
Quertemont <i>et al.</i> (1998)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	NR	NR	2	-	-	E2
Quertemont & De Witte (2001)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	15	2,1	0,25	-	-	E1
Quertemont & De Witte (2001)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	15	4,2	0,5	-	-	E2
Quertemont & De Witte (2001)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	15	8,5	1	-	-	E3 -
Quertemont & De Witte (2001)	W	16-1-8	20/30-20-20-20	6 e 24-NA-24	24; 6 e 0; -24	E (x8)	0	ip	15	17	2	-	-	E4 -
<b>Protocolos curtos de condicionamento em aparatos com disposição radial das câmaras de condicionamento e disposição lateral da câmara de acesso</b>														
Morse <i>et al.</i> (2000)	W	0-1-2	NA-20-20-20	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-600	ip	12,7	20	2	-	-	E1
Morse <i>et al.</i> (2000)	W	0-1-2	NA-20-20-20	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-600	ip	12,7	30	3	-	-	E2 -
Morse <i>et al.</i> (2000)	W	0-1-2	NA-20-20-20	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	-600	ip	12,7	40	4	-	-	E3 -
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	15,9	2	0,25	-	-	E1
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	31,8	2	0,5	-	-	E2
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	31,8	2	0,5	-	-	E5-E8
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	63,6	2	1	-	-	E3
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	95,5	2	1,5	-	-	E4 -
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	15,9	2	0,25	-	-	E1
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	31,8	2	0,5	-	-	E2
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	31,8	2	0,5	-	-	E4-E9
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	W	0-1-6	NA-15-45-15	NA-NA-6 e 24	NA; NA; 24; 24	E-V; V-E	0	ip	63,6	2	1	-	-	E3
<b>Protocolos longos de condicionamento em aparatos com câmara de acesso estilo corredor</b>														
Haleem <i>et al.</i> (2005)	W	0-1-12	NA-10-30-10	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	V-E	0	ip	NR	NR	1	E1	-	-
Biała & Lagwiński (1996a)	W	1-1-20	15-15-30-15	NA-NA-4 e 24	24; NA; 24; 24	V-E	0	ip	20	5	1	E1	-	-
Biała & Lagwiński (1996b)	W	2-1-18	15-15-30-15	NA-NA-4 e 24	24; NA; 24; 24	V-E	0	ip	20	5	1	E1-E3	-	-
<b>Protocolos de MCL com fase de pré-exposição ao etanol em aparatos com câmara de acesso estilo corredor</b>														
Kotłinska <i>et al.</i> (2004)	W	0-1-8	NA-15-30-15	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	12,7	5	0,5	E1-E2	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2007)	W	0-1-8	NA-15-30-15	NA-NA-24	NA; NA; 24; 24	E-V	0	ip	10	10	0,5	E1	-	-
Biała & Kotłinska (1999)	W	1-1-8	15-15-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	-5	ip	10	6,5	0,5	E1-E2	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2011)	W	1-1-8	15-15-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	5	0,5	E1-E3	-	-
Gibula-Bruzda <i>et al.</i> (2015)	W	1-1-8	15-15-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	5	0,5	E1-E15	-	-
Gawel <i>et al.</i> (2016)	W	1-1-8	15-15-30-15	NA-NA-24	24; NA; 24; 24	E-V	0	ip	12,7	2	0,5	E2-E16	-	-

**Nota:** Nas sessões de linha de base e de teste, Morse *et al.* (2012) permitiram que os animais tivessem acesso às 3 câmaras distais radialmente dispostas à câmara de acesso. Entretanto, durante o condicionamento, os animais só foram confinados em duas das câmaras distais, as quais foram diferencialmente pareadas com a administração de etanol e de veículo.

**Lin**, linhagem de *Rattus norvegicus*; **Nº S (H-LB-C)**, número de sessões de habituação, linha de base e condicionamento; **DS (H-LB-C-T, min)**, duração (em minutos) das sessões de habituação, linha de base, condicionamento e teste; **IES (H-LB-C, h)**, intervalo (em horas) entre as sessões de habituação, entre as sessões de linha de base e entre as sessões de condicionamento; **IIF (H-LB; H-C; LB-C; C-T, h)**, intervalo interfásico (em horas) habituação-linha de base, habituação-condicionamento, linha de base-condicionamento, e condicionamento-teste; **OSC**, ordem das sessões de condicionamento; **IEE**, intervalo entre estímulos; **Via**, via de administração; **Conc**, concentração da solução de etanol administrada; **Vol**, volume da solução de etanol administrada; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo/falha de condicionamento; **W**, linhagem Wistar; **NA**, não se aplica; **NR**, não relatado; **E**, solução de etanol; **V**, veículo da solução de etanol; **ip**, via de administração intraperitoneal (injeção); **En**, experimento acerca do qual os dados e os resultados são referentes.

No caso dos efeitos de protocolos  $C \leq 10$ , 3 problemas impedem a análise detalhada. Em primeiro, os efeitos nos aparatos com câmara de estilo corredor, são difíceis de discernir em decorrência dos protocolos empregados por Quertemont *et al.* (1998) e Quertemont e De Witte (2001), os quais se diferenciam de todos os demais protocolos empregados na literatura. Como dito anteriormente, Quertemont *et al.* (1998) e Quertemont e De Witte (2001) dissociaram a apresentação dos estímulos a serem condicionados do confinamento nas câmaras distais do aparato. Essa dissociação levou à modificação da ordem das fases do protocolo de MCL, com realocação da (a) fase de habituação de forma que a mesma se sobrepusesse à fase de condicionamento, e (b) da fase de linha de base para período posterior à fase de condicionamento. Portanto, diante da falta de dados comparados, não é possível fazer avaliação confiável desses experimentos e a reportagem de Gawel *et al.* (2016) de protocolo  $C \leq 10$  só pode ser comparada com os dados de experimentos com protocolos  $C \geq 12$  e com fase de pré-exposição ao etanol.

Em segundo, o uso do aparato com disposição radial das câmaras de condicionamento, associado a protocolo  $C \leq 10$  utilizado por Morse *et al.* (2012) também é de difícil análise. Nas sessões de linha de base e de teste, Morse *et al.* (2012) permitiram que os animais tivessem acesso às 3 câmaras distais radialmente dispostas à câmara de acesso. Entretanto, durante o condicionamento, os animais só foram confinados em duas das câmaras distais, as quais foram diferencialmente pareadas com a administração de etanol e de veículo. Como esse aparato e o protocolo só foram utilizados por um grupo de pesquisa e somente num artigo, não há forma confiável de análise dos dados correspondentes.

Por último, os dados dos aparatos com disposição lateral da câmara de acesso provêm de 2 artigos publicados pelo mesmo grupo de pesquisa, Zarrindast *et al.* (2010) e Rezayof *et al.* (2012). Esses pesquisadores relataram ter mantido constante o volume administrado em 2 mL/kg e variado a concentração da solução administrada de forma a obterem as doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 g/kg. Se esse dado procede, a dose de 1 g/kg foi administrada numa concentração (v/v) de 63,6% e a de 1,5 g/kg numa concentração de 95,5%. Visto que essas concentrações são consideradas extremamente tóxicas, causando extensos danos periféricos (Bode, 1980), é provável que erro tenha sido cometido no relato de doses administradas ou do volume utilizado.

No caso de protocolos  $C \geq 12$  e de protocolos com fase de pré-exposição, experimentos só foram reportados para o aparato com câmara de acesso estilo corredor. No primeiro caso, todos os experimentos reportados utilizaram a dose de 1 g/kg e resultaram em PCL. No segundo, todos os experimentos utilizaram a dose de 0,5 g/kg e resultaram em PCL. Quando a falha de condicionamento obtida por Gawel *et al.* (2016) em protocolo curto de condicionamento é

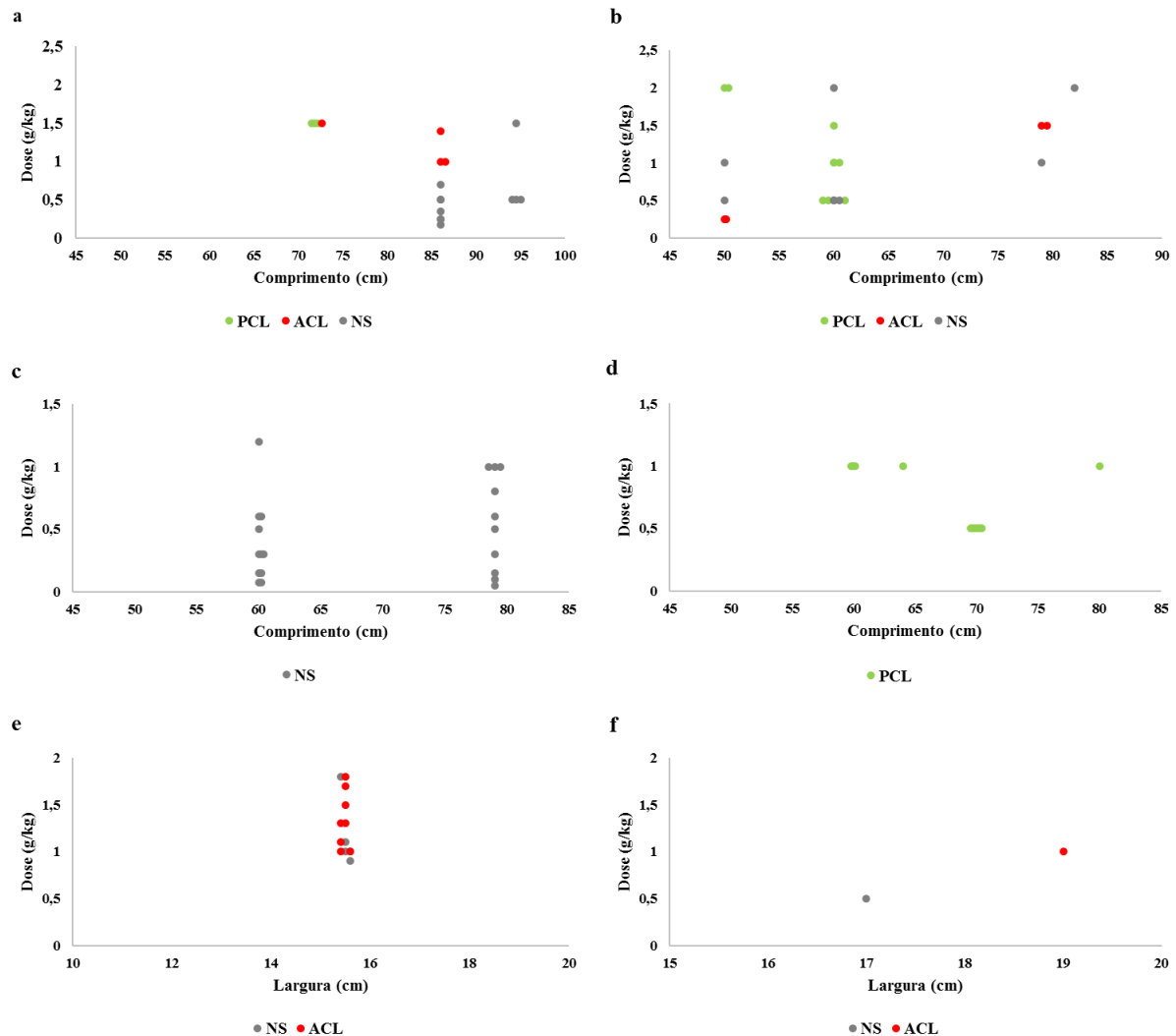
comparada com os estabelecimentos de PCL, a comparação indica que Gawel *et al.* (2016) utilizaram uma sessão de habituação e uma sessão de linha de base associadas com 8 sessões de condicionamento, usando dose de 0,5 g/kg. Assim sendo, a falha de condicionamento reportada por Gawel *et al.* (2016) é mais facilmente entendida por efeitos de inibição latente que por efeitos advindos do aparato e esses aparatos podem ser classificados de acordo com o comprimento total dos mesmos. Além disso, como Biała e Kotłinska (1999), Kotłinska *et al.* (2004; 2007; 2011), Gawel *et al.* (2016) e Gibela-Bruzda *et al.* (2015) empregaram protocolo de pré-exposição ao etanol baseado no protocolo de Bienkowski *et al.* (1995; 1996), é provável que os resultados de PCL reportados por esses pesquisadores derivem de efeito ansiolítico da dose de 0,5 g/kg.

Considerando o conjunto de dados analisado nessa seção, há fortes indícios de relações entre (a) dose de etanol administrada, (b) dimensões dos aparatos, (c) número total de sessões de habituação (sessões da fase de habituação mais sessões da fase de linha de base) e (d) tipo de fase de habituação (habituação aos estímulos a serem condicionados ou habituação ao aparato sem apresentação dos estímulos). De forma a avaliar essas relações, na Figura 1.7 foram reunidos os resultados para administração intraperitoneal em (a) protocolos  $C \leq 10$  e  $C \geq 12$  nos aparatos  $C < 75$ ,  $C > 75$  e em (b) protocolos  $C \leq 10$  nos aparatos  $L < 20$ .

A Figura 1.7a mostra a interação do comprimento dos aparatos com as doses administradas em protocolos  $C \leq 10$  sem sessões de habituação aos estímulos para animais W e S-D. Como foi mostrado na sessão 3.2, na medida em que os aparatos aumentam em comprimento, menor a probabilidade de condicionamento bem-sucedido. Na Figura 1.7b, vê-se a mesma interação modulada pela presença de uma sessão de habituação aos estímulos. Em comparação com a Figura 1.7a, a Figura 1.7b apresenta mais dados de aparatos  $C < 75$ , o que possibilita ver com maior precisão o intervalo de doses de etanol que sustenta condicionamento bem-sucedido nesses aparatos. Pode-se notar o mesmo padrão de resultados descrito para a Figura 1.7a. Além disso, o intervalo de doses capaz de sustentar condicionamento bem-sucedido também parece diminuir progressivamente com o aumento do comprimento e, na medida em que isso ocorre, parece haver enviesamento de condicionamento bem-sucedido à ACL.

A Figura 1.7c dispõe os dados da interação comprimento *vs* dose segundo presença de duas ou mais sessões de habituação aos estímulos em protocolos  $C \leq 10$ . Em comparação com os dados das Figuras 1.7a e 1.7b, a mudança de distribuição de resultados é drástica: tanto em aparatos  $C > 75$  quanto em aparatos  $C < 75$ , nenhum protocolo  $C \leq 10$  foi bem-sucedido quando ocorreu emprego de duas ou mais sessões de habituação aos estímulos. Essa mudança sugere

que os efeitos deletérios da inibição latente são mais importantes que o tipo de aparato ou a dose administrada quando duas ou mais sessões de habituação são utilizadas em protocolos  $C \leq 10$ .



**Figura 1.7.** Relações entre dose, dimensões dos aparatos, número total de sessões de habituação e tipo de habituação nos resultados reportados para a via de administração intraperitoneal em linhagens albinas heterogênicas de *Rattus norvegicus*.

**a.** Protocolos curtos de condicionamento sem sessão de habituação aos estímulos, realizados em aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ . **b.** Protocolos curtos de condicionamento associados com uma sessão de habituação aos estímulos, realizados em aparatos  $C > 75$  e  $C < 75$ . **c.** Protocolos curtos de condicionamento associados com duas ou mais sessões de habituação aos estímulos, realizados em aparatos  $C > 75$  e  $C < 75$ . **d.** Protocolos longos de condicionamento associados com uma ou mais sessões de habituação aos estímulos, realizados em aparatos  $C > 75$  e  $C < 75$ . **e.** Protocolos curtos de condicionamento sem fase de habituação ou associados com uma sessão de habituação ao aparato, realizados em aparatos  $L < 20$ . **f.** Protocolos curtos de condicionamento associados com duas sessões de habituação aos estímulos, realizados em aparatos  $L < 20$ .

**PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, resultado não significativo/falha de condicionamento.

De forma a ilustrar todos os resultados reportados, foi necessário modificar ligeiramente (até  $\pm 0,5$  cm) os dados de dimensões quando a mesma dose foi reportada mais de uma vez para aquela dimensão. Assim, os dados dispostos para comprimento e largura são somente para referência. Dados exatos de comprimento e largura em relação às doses podem ser obtidos pelo cruzamento dos dados dispostos na Tabela 1.5 com os dados das Tabelas 1.6 a 1.9.

Por sua vez, a Figura 1.7d dispõe os efeitos do aumento do número de sessões de condicionamento (i.e., de protocolos  $C \geq 12$ ) sobre a inibição latente causada por uma (Haleem



*et al.*, 2005, 1 experimento) ou mais sessões de habituação. Em comparação com a Figura 1.7c, a mudança de distribuição de resultados também é drástica: quando o número de sessões de condicionamento é igual ou maior que 12, os efeitos da inibição latente são superados e condicionamento de PCL é realizado mesmo em aparatos  $C > 75$ . Já a Figura 1.7e apresenta a interação entre doses e largura nos aparatos  $L < 20$  segundo protocolos  $C \leq 10$  associados com (a) nenhuma sessão de habituação aos estímulos ou (b) com sessões de habituação ao aparato sem a presença dos estímulos a serem condicionados. Pode-se ver que efeitos de inibição latente são negligenciáveis no caso de *b*. Em contrapartida, a Figura 1.7f apresenta a mesma interação em aparatos  $L < 20$  para protocolos curtos de condicionamento associados com duas sessões de habituação. Devido à baixa frequência de resultados, não é possível dizer claramente os efeitos da inibição latente nesse caso.

A partir disso, pode-se estabelecer critérios de escolha de amostra à análise estatística. Primeiro, somente dados advindos da via de administração intraperitoneal foram selecionados à análise. Tal escolha se deve ao evite de influência na análise das diferentes farmacocinéticas e farmacodinâmicas do etanol provenientes de diferentes vias de administração. Além disso, foram relatados poucos experimentos utilizando via intragástrica para aparatos  $C < 75$  e nenhum experimento utilizando via intravenosa foi descrito aos aparatos  $L < 20$  e  $C < 75$ . Em segundo, somente as doses no intervalo de 0,5 e 2,0 g/kg foram comparadas. Essa escolha se embasa tanto na distribuição desigual de doses inferiores e superiores para cada tipo aparato, quanto no evite de influência de pseudo-condicionamento. Em terceiro, por motivos anteriormente expostos, foram excluídos da análise os dados de Zarrinsdast *et al.* (2010), Rezayof *et al.* (2012), Morse *et al.* (2000), Quertemont *et al.* (1998) e de Quertemont e De Witte (2001).

Quando, em aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ , protocolos  $C \leq 10$  sem sessão de habituação associada foram comparados com protocolos  $C \leq 10$  associados à uma sessão de habituação aos estímulos, não houve diferença significativa na distribuição dos resultados (teste exato de Fisher = 3,463,  $p = 0,192$ ). Esse resultado indica que esses protocolos podem ser combinados num só grupo. Quando, em aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ , esses protocolos combinados foram comparados com protocolos  $C \leq 10$  associados com duas ou mais sessões de habituação aos estímulos, houve diferença significativa na distribuição de resultados (teste exato de Fisher = 12,166,  $p = 0,002$ ). Esses resultados confirmam a interação entre inibição latente e o intervalo de doses capaz de estabelecer tanto PCL quanto ACL em protocolos  $C \leq 10$ , sendo que o aumento de número de sessões de habituação rivaliza os efeitos das soluções de etanol administradas no condicionamento.

Quando, em aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ , protocolos  $C \leq 10$  associados com duas ou mais sessões foram comparados com protocolos  $C \geq 12$  associados com duas ou mais sessões de habituação, a distribuição de resultados também resultou diferente ( $\chi = 29,000$ ,  $p < 0,001$ ). Esse resultado confirma a interação entre inibição latente e número de sessões de condicionamento. Quando os protocolos de condicionamento apresentam 10 ou menos sessões, os efeitos deletérios de duas ou mais sessões de habituação causam falha de condicionamento, sendo que esses efeitos são superados pelo aumento do número de sessões de condicionamento.

Quando os protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação advindos de aparatos  $L < 20$  foram comparados com os protocolos  $C \geq 12$  associados com duas ou mais sessões de habituação aos estímulos advindos de aparatos  $C > 75$ , houve diferença significativa ( $\chi = 12,257$ ,  $p < 0,001$ ). Esse resultado confirma que os efeitos de inibição latente são negligenciáveis nos protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação realizados em aparatos  $L < 20$ . Quando os protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação realizados em aparatos  $L < 20$  foram comparados com os protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação aos estímulos advindos de aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ , houve diferença significativa (teste exato de Fisher = 15,578,  $p < 0,001$ ). Esse resultado confirma que os aparatos  $L > 20$  diferem dos aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  na produção de PCL, ACL e NS em protocolos  $C \leq 10$ , visto que em ambos os casos efeitos de inibição latente não estão presentes.

De outro modo, na seção 3.2, quando da comparação de aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$ , (a) não foram excluídos dados de doses menores ou maiores que o intervalo 0,5 e 2,0 g/kg, (b) não foram discernidas possíveis diferenças em farmacocinética e em farmacodinâmica advindas de diferentes vias de administração, (c) nem foram analisados possíveis efeitos de inibição latente diferencialmente distribuída nos aparatos. Assim, as diferenças lá detectadas podem ser decorrentes desses fatores todos e não dos aparatos *per se*. Com o intuito de confirmar as diferenças entre aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  detectadas na seção 3.2, os dados utilizados na análise estatística dessa seção foram reorganizados de acordo com o tipo de aparato, i.e.,  $C < 75$  e  $C > 75$ , e nova comparação foi realizada. Em acordo com as diferenças detectadas na seção 3.2, aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  também diferiram segundo essa organização de dados (teste exato de Fisher = 16,461,  $p < 0,001$ ), na qual foram comparados protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação aos estímulos. Esse resultado indica que as diferenças encontradas na seção 3.2 entre aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  não são atribuíveis aos efeitos de distribuição desigual de inibição latente ou de vias de administração e de doses entre os tipos de aparatos.

Tomados em conjunto, esses resultados confirmam interações entre (a) número de sessões de habituação aos estímulos, (b) número de sessões de condicionamento, (c) doses de

etanol utilizadas e (d) dimensões dos aparatos utilizados na obtenção de PCL, ACL e NS. Quando doses entre 0,5 e 2,0 g/kg (administração intraperitoneal; animais H) são usadas em protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação em aparatos  $L < 20$ , há maior probabilidade de condicionamento de ACL, em especial, e de falha de condicionamento. Quando doses entre 0,5 e 2,0 g/kg (administração intraperitoneal; 0,5 a 1,0 g/kg para animais W; 0,5 a 2,0 g/kg para animais S-D) são usadas em protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação em aparatos  $C < 75$ , há maior probabilidade de condicionamento de PCL. Quando doses entre 0,5 e 2,0 g/kg (administração intraperitoneal) são usadas em protocolos  $C \leq 10$  associados com duas ou mais sessões de habituação em  $C < 75$ , há maior probabilidade de falha de condicionamento (NS). O aumento do número de sessões de condicionamento restabelece a maior probabilidade de condicionamento de PCL.

Quando doses entre 0,5 e 2,0 g/kg são usadas em protocolos  $C \leq 10$  associados com até uma sessão de habituação em aparatos  $C > 75$ , há maior probabilidade de falha de condicionamento (NS) para doses mais baixas (0,5 g/kg para animais W; 1 g/kg para animais S-D) e de obtenção de ACL em doses mais altas. Além disso, na medida em que o comprimento dos aparatos  $C < 75$  aumenta, há aumento da probabilidade de falha de condicionamento em doses mais altas no intervalo anteriormente especificado. Quando doses entre 0,5 e 2,0 g/kg são usadas em protocolos  $C \leq 10$  associados com duas ou mais sessões de habituação em aparatos  $C > 75$ , há maior probabilidade de falha de condicionamento. Em ambos os casos, o maior número de sessões de condicionamento aumenta a probabilidade de condicionamento de PCL em doses baixas e mudam a valência de doses altas (de ACL para NS). Também é possível que o maior número de sessões de condicionamento mude a valência de condicionamento bem-sucedido (i.e., de ACL para PCL) com doses mais altas do intervalo, quando os aparatos  $C > 75$  não são muito compridos.

#### 4 CONCLUSÕES

Na apresentação deste trabalho, foi apontado que há baixa reprodutibilidade de resultados na literatura de MCL com etanol em ratos e foram listadas 8 diferentes interpretações propostas com o intuito de se explicar essa baixa reprodutibilidade. Frente à análise realizada neste capítulo, nenhuma das interpretações propostas parece relevante ou pertinente. Como visto nas seções anteriores, a análise indica que aparatos *per se* aumentam a probabilidade de obtenção de um ou outro resultado, de acordo com a variação de comprimento e de largura dos mesmos: aparatos de largura menor que 20 cm (aparatos  $L < 20$ ) aumentam a probabilidade de condicionamento de ACL; aparatos com comprimento menor que 75 cm e largura maior que

20 cm (aparatos  $C < 75$ ) aumentam a probabilidade de condicionamento de PCL; aparatos com comprimento maior que 75 cm e largura maior que 20 cm (aparatos  $C > 75$ ) aumentam a probabilidade de falha de condicionamento. Os motivos dessa influência parecem estar relacionados com variáveis etológicas/ecológicas relevantes ao comportamento ambulatório/exploratório horizontal de ratos.

A falha de reconhecimento desse fator na literatura pode ser compreendida quando verificamos que desde a década de 1980 até meados da década de 1990 somente aparatos  $L < 20$  cm ou  $C > 75$  foram utilizados em protocolos curtos de condicionamento com etanol. Antes disso, apenas Black *et al.* (1973) havia utilizado aparato cujas dimensões são de transição entre a classe  $L < 20$  e a classe  $C < 75$ . O motivo dessa diferença temporal reside no fato de que no início década de 1980 a utilização do MCL se intensificou para estudo de drogas opioides e, em especial, psicoestimulantes (Schechter & Calganetti, 1993). Paulatinamente, o uso foi generalizado a outros fármacos, incluindo o etanol. Dado que (a) aparatos de 3 câmaras são mais eficientes ao condicionamento de PCL em psicoestimulantes (Bardo *et al.*, 1995), (b) que aparatos de 3 câmaras tenderam a ter comprimento maior que 75 cm naquelas décadas e (c) que a maioria dos artigos de MCL com etanol das décadas de 1980 e de 1990 reportaram também condicionamento com opioides e com psicoestimulantes como método de validação de seus aparatos, estava aberto o caminho à alta frequência de falha de condicionamento ao local ou de obtenção de ACL com etanol tal qual conhecemos hoje em dia.

Adicionalmente, como a variável aparato está relacionada com variáveis etológicas/ecológicas relevantes ao comportamento ambulatório/exploratório horizontal de ratos, o sistema de alocação segundo o qual os animais são agrupados influencia a obtenção de resultados nas diferentes classes de aparatos por conta dos efeitos que esse possui sobre o comportamento ambulatório de ratos (Arakawa, 2003; 2005). Nesse ponto, não é discernível se a maior probabilidade de obtenção de ACL nos aparatos  $L < 20$  em comparação com os aparatos  $C > 75$  advém daqueles aparatos *per se* ou é derivada de interações entre a referida classe e o sistema de alocação. Experimentos são necessários ao esclarecimento desse dado. Além disso, o sistema de alocação também parece influenciar os resultados em aparatos  $C < 75$  quando o comprimento do aparato nessa classe aumenta. Ao menos em parte, esse dado esclarece as diferenças de resultados obtidos por Morales *et al.* (2012) e por Busse *et al.* (2005).

Por outro lado, essas influências dos aparatos sobre as probabilidades de obtenção de um ou de outro resultado também interagem com o número de sessões de habituação, isto é, o número de sessões da fase de habituação mais o número de sessões da fase de linha de base: na medida em que o número de sessões de habituação aumenta, diminui a probabilidade de

condicionamento bem-sucedido nos aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  quando protocolos de condicionamento com 10 ou menos sessões são empregados. Esse efeito deletério do aumento de número de sessões de habituação sobre a probabilidade de condicionamento bem-sucedido é compatível com os dados gerais da literatura de condicionamento clássico e é mais relevante aos aparatos  $C < 75$  e  $C > 75$  que o sistema de alocação. Adicionalmente, a grande magnitude desse efeito deletério a partir de duas sessões de habituação sugere que no MCL o etanol é mais sensível aos efeitos de inibição latente que drogas opioides e psicoestimulantes, mas não que o etanol tenha menor propriedade reforçadora que essas drogas, relevando-se a baixa potência farmacológica do mesmo.

Ademais, o aumento de dificuldade de estabelecimento de PCL a partir (a) do sistema de alocação, (b) do aumento do comprimento dos aparatos e (c) do número de sessões de habituação pode ser revertido com o aumento do número de sessões de condicionamento para além de 10 sessões, ao menos para animais W. A mesma conclusão é aplicável aos protocolos de MCL associados com fase de pré-exposição, mas nesse caso o estabelecimento de PCL é realizado por reforçamento negativo advindo de estresse e esse protocolo é mais sensível aos efeitos deletérios da alocação individual. Ao esclarecimento desse ponto, pesquisas experimentais são necessárias.

Por último, as doses de etanol utilizadas também interagem com todos os fatores acima listados e influenciam diferencialmente a probabilidade de obtenção de PCL, ACL e NS, de acordo com a via de administração e com a linhagem albina utilizada. Na amostra revisada, a obtenção de PCL está ligada ao intervalo de doses de 0,5 até 2,0 g/kg em ratos S-D e ao intervalo de doses de 0,5 até 1,0 g/kg para ratos W (administração intraperitoneal em ambos os casos). Doses maiores que estas têm maior probabilidade de gerar ACL e doses menores possuem maior probabilidade de gerar NS. Todavia, devido à baixa diversidade na frequência de doses por linhagem, por sistema de alocação e por aparatos, essa interpretação não foi testada diretamente por análise estatística e deve ser levada apenas como referência. Pesquisa experimental também é necessária à resolução desse ponto.

Em contrapartida, se a análise realizada nesse capítulo indica que (a) as interpretações presentes na literatura não são relevantes à compreensão dos fatores que produzem tamanha diversidade de resultados e (b) esclarece variáveis relevantes, a mesma (c) não alcança outras fontes de variabilidade cujos dados não estão disponíveis ou ocorrem em baixa frequência na literatura revisada. Não foram examinadas as influências de variáveis relacionadas ao animal-modelo (idade, ciclo circadiano, horário dos experimentos), aos tipos de aparatos segundo a classificação *com* e *sem viés*, às modalidades estimulatórias empregadas, à duração ótima das

sessões de condicionamento e de teste. Também não foi estabelecido qual seria o limite inferior do comprimento de aparatos adequados ao condicionamento de PCL e o limite superior foi estabelecido arbitrariamente. Logo, é provável que outras variáveis estejam influenciando diferencialmente a obtenção de PCL, ACL e NS.

## CAPÍTULO 2: ESTUDO EXPERIMENTAL

### 1 INTRODUÇÃO

Como exposto anteriormente, a análise de distribuição de resultados realizada no capítulo 1 deste trabalho não foi capaz de distinguir as possíveis influências de muitas variáveis presentes nas metodologias revisadas. Por exemplo, variáveis como (a) as interações de ciclo circadiano e horário dos experimentos, (b) idade dos animais, (c) protocolo de condicionamento com ou sem viés, (d) intervalo interfásico e (e) diferenças entre as linhagens albinas heterogênicas na sensibilidade ao etanol não foram analisadas por conta da baixa frequência de reportagem ou por conta da grande variabilidade nas mesmas: ambos fatores resultaram em baixa frequência de variações específicas de dados para que análise de distribuição de resultados fosse aplicável.

Tendo em vista que essas variáveis podem influenciar diferencialmente resultados conflitantes dentro de desenhos experimentais que guardam grande similaridade entre si e que estão dentro dos parâmetros especificados para o condicionamento de PCL, há a necessidade de exame experimental dessas variáveis. Por exemplo, Busse *et al.* (2005) e Morales *et al.* (2012) utilizaram ratos da mesma linhagem (S-D), a mesma dose de etanol (1,5 g/kg) administrada pela mesma via (intraperitoneal) em concentrações e volumes muito similares e aparatos com comprimentos (72 cm e 72,4 cm, respectivamente) descritos como adequados ao condicionamento de PCL. Também fizeram uso de protocolos de condicionamento sem fases de habituação e de linha de base, com as mesmas durações de sessões de condicionamento (30 min) e de teste (15 min) e os mesmos intervalos entre sessões (24 h), interfásicos (24 h) e entre estímulos (zero). Entretanto Morales *et al.* (2012) reportaram estabelecimento de PCL e Busse *et al.* (2005) reportaram estabelecimento de ACL. Claramente, outras variáveis podem estar influenciando a obtenção de um ou de outro resultado.

De fato, além de Morales *et al.* (2012) terem utilizado 4 sessões de condicionamento e Busse *et al.* (2005) terem usado 8 sessões (o que não explica as diferenças de resultados), há diferenças relacionadas ao sistema de armazenamento dos animais em gaiolas-viveiro (grupais e individuais, respectivamente) e relacionadas com o ciclo-circadiano utilizado e com o horário no qual os experimentos foram realizados. Morales *et al.* (2012) empregaram um ciclo claro-escuro 14/10 (luzes acesas às 07:00 h) e realizaram os experimentos a partir de 4 h após o início da fase clara, num período que se estende das 10:00 às 11:00 h. Busse *et al.* (2005) usaram ciclo 12/12 (luzes acesas às 08:00 h) e realizaram os experimentos a partir de 1 h após o início da fase clara, num período que se estende das 09:00 às 14:00 h. Visto que os ciclos

circadianos/biológicos subjetivos dos animais são sincronizados por *zeitgebers*<sup>13</sup> e que os efeitos do etanol podem tanto influenciar quanto ser influenciados por esses ciclos (Danel & Touitou, 2004), há possibilidade de que essa variável afete diferencialmente os protocolos de MCL utilizados por Morales *et al.* (2012) e por Busse *et al.* (2005).

Adicionalmente, desde o estudo de McAllistar, McAllister, Weldin e Cohen (1974) acerca do aumento do intervalo entre sessões de condicionamento de medo, sabe-se que intervalos maiores aumentam a efetividade do condicionamento clássico em várias preparações/modelos (Gibbon, Baldock, Locurto, Gold, & Terrace, 1977; Haggblom, 1978). Assim, os dados de Bahi (2013) e de Bahi e Dreyer (2013) apontam a possibilidade desse efeito também ocorrer no MCL quanto ao intervalo interfásico linha de base-condicionamento: o aumento do referido intervalo para além de 24 h parece contornar os efeitos de inibição latente. Os dados de Black *et al.* (1973) também apontam essa possibilidade, acrescido o fato de que esses pesquisadores também aumentaram de 24 para 48 h o intervalo entre as sessões de condicionamento e o intervalo interfásico condicionamento-teste. Dado que o condicionamento ao local com etanol aparenta ser especialmente suscetível aos efeitos de inibição latente, essa é uma variável de interesse para análise experimental.

Ademais, anteriormente foi apontado que é problemática a comparação de resultados advindos de protocolos de MCL que apresentam diferentes durações de sessões de teste. Foi argumentado que variações na duração dos testes dificultam a comparação dos resultados obtidos, já que efeitos advindos de diferentes oportunidades de resposta no teste não são discernidos de efeitos provenientes dos procedimentos de condicionamento. Isso é especialmente importante quando da comparação de resultados obtidos a partir de diferentes vias periféricas de administração, visto que essas influenciam diferencialmente o desenvolvimento temporal da farmacocinética e das concentrações encefálicas totais do etanol (Livy *et al.*, 2003; Nurmi *et al.*, 1994; Walker & Ehlers, 2009). Por exemplo, a duração de sessões de condicionamento adequada à via intraperitoneal pode ser divergente da duração adequada à via intragástrica, mas isso não pode ser discernido quando testes de diferentes durações são utilizados.

Bitterman (1965) relatou que, ao estudar o condicionamento de esquiva no *goldfish* (*Carassius auratus*), problemas similares estavam presentes naquela literatura específica. Para

---

<sup>13</sup> Em cronobiologia, *Zeitgeber* é um evento ambiental (ocorrência de luz ou escuridão, por exemplo) que sincroniza os relógios biológicos de um organismo aos ciclos de 24 horas e de 12 meses. Por exemplo, a mudança de temperatura corporal sincroniza relógios biológicos hepáticos, pancreáticos e renais, enquanto a luz sincroniza relógios hipotalâmicos (Buhr, Yoo, & Takahashi, 2010).



contornar esta situação, sugeriu e usou desenho de transferência nas situações de teste pós-condicionamento. Grupos independentes foram treinados em diferentes arranjos de condicionamento e todos os grupos foram examinados em teste pós-condicionamento com a mesma duração. Este desenho permitiu que se discernisse oportunidade de resposta nos testes dos efeitos dos procedimentos de condicionamento em si, e pode ser aplicado tanto nos procedimentos de habituação/linha de base, quanto nos de teste pós-condicionamento utilizados no MCL.

Além disso, no caso do teste pós-condicionamento de experimentos sem sessões linha de base, a ferramenta analítica identificada como análise temporal por Walsh e Cummings (1976) pode ser aplicada de forma a examinar a possibilidade de desenvolvimento de diferentes resultados caso menores sessões de teste pós-condicionamento houvessem sido utilizadas. Tal aplicação é embasada na suposição de que, como uma ferramenta analítica e não uma variável experimental, a análise temporal não interferiria com a credibilidade dos resultados obtidos, mas sim facilitaria a seleção posterior de protocolos experimentais adequados para o condicionamento de preferência ao local induzido por etanol em ratos.

Por último, na análise metodológica realizada no capítulo anterior, tomou-se o comprimento de 75 cm como limite entre os aparatos que aumentam a probabilidade de obtenção de condicionamento bem-sucedido (especialmente PCL) e dos que aumentam a probabilidade de falha de condicionamento. Tal escolha foi arbitrariamente realizada com base na literatura (Asin *et al.*, 1985; Bieńkowski *et al.*, 1996; Busse *et al.*, 2005; Martijena *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2012; Pascual *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016). Ainda assim, essa escolha carece de base experimental, i.e., de demonstração de que condicionamento ao local ocorre em aparato com 75 cm de comprimento no intervalo de doses que geralmente causa PCL em aparatos de comprimento menor.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os efeitos comportamentais de variações nos arranjos experimentais de condicionamento ao local induzido por etanol em ratos em aparatos de 3 câmaras com 75 cm de comprimento.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se condicionamento ao local ocorre em aparatos de 3 câmaras com 75 cm de comprimento;

- Verificar se variáveis como (a) presença e ausência de linha de base, (b) duração dos intervalos interfásicos linha de base-condicionamento e condicionamento-teste (c) duração dos intervalos entre as sessões de condicionamento e (d) horário de condicionamento influenciam o desenvolvimento de preferência condicionada ao local ou de aversão condicionada ao local, induzidas por etanol em ratos;

- Realizar análise do desenvolvimento temporal de preferência/aversão condicionada nas sessões de teste dos experimentos.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 SUJEITOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados 70 ratos Wistar machos adultos com 60 dias de idade (ratos adultos jovens segundo a classificação de Sengupta, 2013) no início dos experimentos. Os animais eram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório da UFRGS (CREAL-UFRGS) e adquiridos com 50 dias de idade. Após a chegada, os animais foram mantidos no Biotério Setorial de Farmacologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFRGS em gaiolas-viveiro de polietileno branco (41x34x16cm), em número de 2 ou 4 por gaiola-viveiro, com livre acesso a água e ração granulada, com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclo claro-escuro 12/12 h (luzes acesas às 07:00 h). O período de aclimação à colônia foi de 10 dias.

#### **3.2 APARATOS EXPERIMENTAIS**

O aparato foi confeccionado em acrílico transparente com duas câmaras distais separadas por uma câmara central, sendo as câmaras dispostas serialmente. As câmaras distais (de condicionamento) apresentam dimensões (C x L x A) de 30 x 40 x 50 cm e a central possui dimensões de 15 x 40 x 50 cm. A passagem entre as câmaras de condicionamento e a câmara central foi permitida por aberturas com dimensões (L x A) de 15 x 15 cm, as quais foram fechadas durante a fase de condicionamento para o confinamento dos animais numa ou em outra câmara distal. As paredes das câmaras distais foram recobertas externamente com diferentes padrões (vertical ou horizontal) de listras branco e preto e as paredes da câmara de acesso foram pintadas de branco. Os solos das câmaras distais foram recobertos com pisos de borracha de texturas diferentes (lisa *vs* rugosa) e o solo da câmara de acesso foi recoberto com material plástico liso, opaco e resistente.

#### **3.3 PROTOCOLOS DOS EXPERIMENTOS DE CONDICIONAMENTO**

Os protocolos foram conduzidos em duas ou em 3 fases (experimentos 1 e 2 e

experimentos 3, 4 e 5, respectivamente). No caso dos protocolos com duas fases, estes apresentaram fase de condicionamento (composta por 8 sessões) e fase de teste (sessão única pós-condicionamento). Os protocolos com 3 fases apresentaram fase de linha de base (sessão única pré-condicionamento), fase de condicionamento (composta por 8 sessões de condicionamento) e fase de teste (sessão única pós-condicionamento).

As variáveis manipuladas nos arranjos de MCL investigados foram: linha de base (0 ou 30 min), intervalo entre as sessões de condicionamento (24 h ou 48 h), intervalos interfásicos linha de base-condicionamento e condicionamento-teste (24 h ou 48 h) e intervalo de horário de condicionamento (das 07:50 às 09:50 h e das 10:30 às 12:30 h; horários de entrada dos animais nos modelos). Os arranjos experimentais componentes de cada experimento encontram-se ilustrados na Tabela 2.1, sendo discriminados os números de animais no grupo experimental e no grupo controle por experimento.

**Tabela 2.1**

Arranjos de MCL investigados e número de sujeitos utilizados.

Exp.	Hora de início	NSLB	DSLB (min)	IIF LB-C (h)	NSC	DSC (min)	ISC (h)	IIF C-T (h)	DST (min)	Via	Dose EtOH (g/kg)	Nº GE	Nº GC
01	07:50	0	NA	NA	8	30	24	24	30	ig	1,2	6	6
02	10:30	0	NA	NA	8	30	24	24	30	ig	1,2	6	6
03	07:50	1	30	24	8	30	24	24	30	ig	1,2	8	8
04	10:30	1	30	24	8	30	24	24	30	ig	1,2	8	8
05	10:30	1	30	48	8	30	48	48	30	ig	1,2	7	7

**Nota:** **Exp.**, experimento; **NSLB**, número de sessões de linha de base; **DSLB**, duração da sessão de linha de base; **IIF LB-C**, intervalo interfásico linha de base-condicionamento; **NSC**, número de sessões de condicionamento; **DSC**, duração (em minutos) das sessões de condicionamento; **ISC**, intervalo (em horas) entre as sessões de condicionamento; **IIF C-T**, intervalo interfásico (em horas) condicionamento-teste; **DST**, duração (em minutos) da sessão de teste; **EtOH**, etanol; **Nº GE**, número de animais no grupo experimental; **Nº GC**, número de animais no grupo controle; **NA**, não se aplica; **ig**, via de administração intragástrica (gavagem).

### 3.3.1 Linha de Base (pré-condicionamento)

A sessão de linha de base foi idêntica em todos os experimentos com 3 fases (experimentos 3, 4 e 5) e teve duração de 30 min. Nessa fase, os animais foram colocados individualmente na câmara central do aparato, com acesso irrestrito a todo o aparato. O critério de entrada em cada câmara foi o posicionamento das duas patas dianteiras na câmara.

Grau de severidade do protocolo: leve (CONCEA, 2016)

### 3.3.2 Condicionamento

Os protocolos de condicionamento foram do tipo pavloviano discriminativo (Stewart, 1992; Stewart & Eikeboon, 1987), com balanceamento de pareamento como critério de seleção

da câmara distal a ser pareada com a administração do etanol, isto é, metade dos animais dos grupos experimentais recebeu etanol na câmara com listras verticais e a outra metade na câmara com listras horizontais. Os animais foram distribuídos em dois grupos em cada um dos arranjos de condicionamento: controle ( $n = 6-8$ ) e experimental ( $n = 6-8$ ). Nas sessões de condicionamento 1, 3, 5 e 7 o tratamento com solução salina (NaCl 0,9 %) foi administrado por gavagem (volume de 10 mL/kg) aos animais do grupo controle e do grupo experimental. Um minuto e meio após a administração, os animais foram confinados numa das câmaras distais do aparato (metade na câmara  $x$ , metade na câmara  $y$ ). Nas sessões de condicionamento 2, 4, 6 e 8 os animais do grupo experimental foram tratados com 1,2 g/kg de solução etanol (12,6% v/v) por gavagem (10 mL/kg) e os animais do grupo controle foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%) com via de administração e volumes correspondentes. Um minuto e meio após o tratamento, os animais foram confinados na outra câmara distal do aparato.

Grau de severidade do protocolo: leve (CONCEA, 2016)

### 3.3.3 Teste (Pós-condicionamento)

A sessão de teste foi idêntica em todos os experimentos e teve 30 min de duração. Nesta fase, os animais foram colocados individualmente na câmara central, com acesso irrestrito a todo o aparato. O critério de entrada em cada câmara foi o posicionamento das patas dianteiras no referido local.

Grau de severidade do protocolo: leve (CONCEA, 2016)

## 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as sessões experimentais foram registradas por meio da webcam C920 Pro HD (Logitech®) em resolução de 720 pixels, sendo os dados coletados e analisados pelo mesmo experimentador.

A resposta comportamental quantificada durante as sessões de linha de base (pré-condicionamento) e teste (pós-condicionamento) foi o tempo de permanência em cada uma das câmaras. O tempo de permanência individual foi registrado e expresso em segundos.

Os resultados grupais foram expressos (em segundos) como média  $\pm$  erro padrão da média. A normalidade dos dados foi avaliada no programa SPSS pelo teste de Shapiro-Wilk, assumindo-se  $\alpha \leq 0,05$ . A análise estatística inferencial foi realizada no mesmo programa utilizando ANOVA bicaudal seguida pelo teste  $t$  de Student (bicaudal), assumindo-se  $\alpha \leq 0,05$  como critério de significância. A análise dos experimentos 1 e 2, e 3 e 4 ocorreu aos pares por conta de cada par experimental poder ser considerado como um único experimento.

### 3.5. CONSIDERAÇÕES BIOÉTICAS

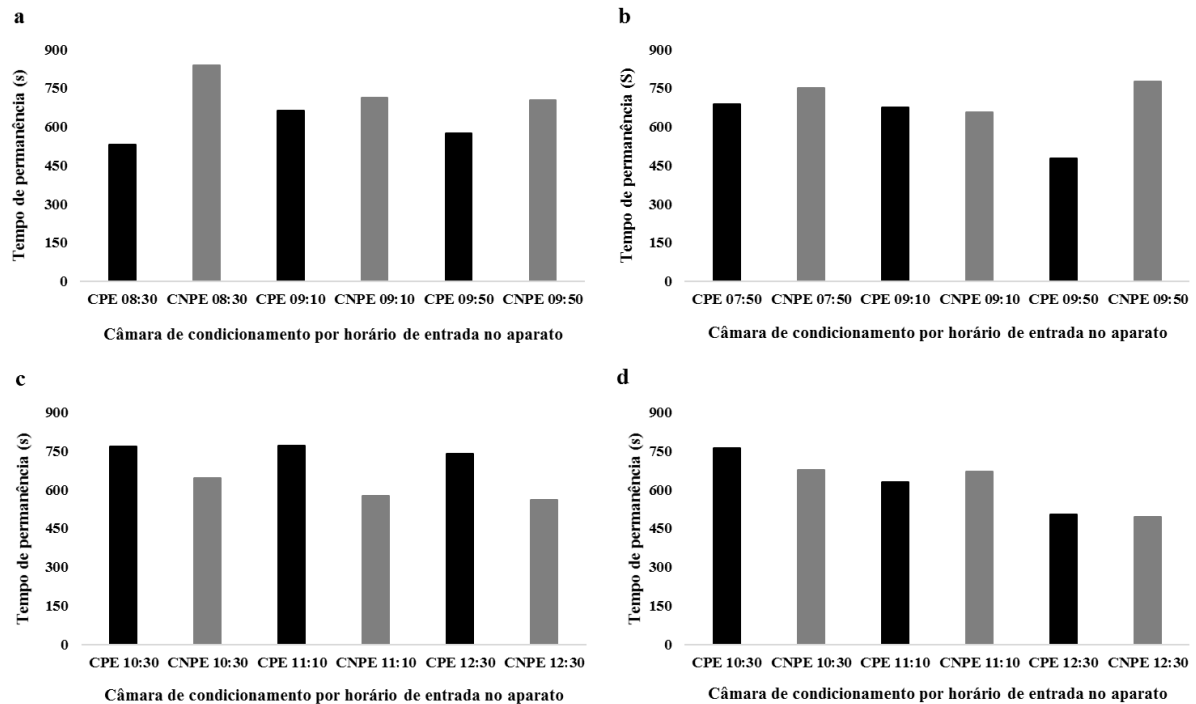
Os experimentos foram realizados de acordo com os preceitos da diretriz legal brasileira sobre uso de animais de experimentação (Lei N° 11.794/2008), além das Resoluções Normativas N° 13 (Eutanásia) e 30 (Cuidado e Utilização) do CONCEA (2013; 2016), envolvendo o amplo bem-estar geral dos animais, com o mínimo de desconforto ou sofrimento na maioria dos procedimentos. Cumpre, adicionalmente, as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da *International Brain Research Organization* (IBRO) e as recomendações do *National Research Council* (NRC), conforme publicadas no *Guide for the care e use of laboratory animals* (NRC, 2010) e no *Guidelines for the care e use of mammals in neuroscience e behavioral research* (NRC, 2003). Deste modo, o projeto que cobre este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS) antes de iniciar-se os experimentos. O projeto foi registrado sob o protocolo N° 29672 e intitulado “*Condicionamento ao local induzido por etanol em ratos: Investigação sistemática de bases metodológicas e neurofisiológicas*”. A carta de aprovação pode ser vista no Anexo A.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTOS 1 E 2

A Figura 2.1 exibe escores individuais dos tempos de permanência na câmara pareada com etanol (CPE) e na câmara não pareada com etanol (CNPE) nos experimentos 1 e 2. A distribuição por horário dos escores individuais disposta na Figura 2.1 sugere queda contínua nos escores individuais obtidos na CNPE de animais tratados com etanol, enquanto que há um aumento brusco nos escores obtidos na CPE a partir das 10:30 h em relação aos valores obtidos no período das 07:50 às 09:50 h. Esses dados indicam modulação circadiana nos efeitos reforçadores/aversivos do etanol no MCL.

De forma a avaliar a possibilidade de aplicação de estatística inferencial paramétrica, a normalidade dos dados foi testada segundo duas organizações. Na primeira organização, os dados foram agrupados como constituindo somente dois grupos (n=12 por grupo): grupo experimental (E0750-1230) e grupo controle (C0750-1230). Na segunda organização, esses mesmos dados foram divididos em 4 grupos (2 experimentais: E0750, E1030; 2 controles: C0750, C1030) segundo os intervalos de horário das 07:50 às 09:50 h e das 10:30 às 12:30 h. Como pode ser visto na Tabela 2.2, as diferentes organizações apresentaram distribuição normal.



**Figura 2.1.** Tempo de permanência individual na câmara pareada com etanol (CPE) e na câmara não pareada com etanol (CNPE) de acordo com os grupos e horários nos experimentos 1 e 2.

**2.1a**, tempo de permanência individual na CPE e na CNPE durante a sessão de teste de animais do grupo experimental no intervalo das 07:50 às 09:50 (Experimento 1; horário de entrada dos animais no modelo); **2.1b**, tempo de permanência individual na CPE e na CNPE durante a sessão de teste de animais do grupo controle no intervalo das 07:50 às 09:50 (Experimento 1; horário de entrada dos animais no modelo); **2.1c**, tempo de permanência individual na CPE e na CNPE durante a sessão de teste de animais do grupo experimental no intervalo das 10:30 às 12:30 (Experimento 2; horário de entrada dos animais no modelo); **2.1d**, tempo de permanência individual na CPE e na CNPE durante a sessão de teste de animais do grupo controle no intervalo das 10:30 às 12:30 (Experimento 2; horário de entrada dos animais no modelo). Barras indicam o escore de cada animal.

## Tabela 2.2

Teste de normalidade dos experimentos 1 e 2.

Grupo	Câmara	Casos				Teste de Shapiro-Wilk			
		Válidos		Ausentes		Estatística	gl	Significância	
N	Porcentagem	N	Porcentagem						
E0750-1230	CPE	12	100%	0	0%	0,960	12	0,784	
E0750-1230	CNPE	12	100%	0	0%	0,899	12	0,152	
C0750-1230	CPE	12	100%	0	0%	0,949	12	0,620	
C0750-1230	CNPE	12	100%	0	0%	0,982	12	0,991	
E0750	CPE	6	100%	0	0%	0,968	6	0,880	
E0750	CNPE	6	100%	0	0%	0,947	6	0,715	
C0750	CPE	6	100%	0	0%	0,936	6	0,628	
C0750	CNPE	6	100%	0	0%	0,946	6	0,711	
E1030	CPE	6	100%	0	0%	0,872	6	0,233	
E1030	CNPE	6	100%	0	0%	0,952	6	0,757	
C1030	CPE	6	100%	0	0%	0,950	6	0,744	
C1030	CNPE	6	100%	0	0%	0,877	6	0,253	

**Nota:** gl, grau de liberdade; N, número; CPE, câmara pareada com etanol; CNPE, câmara não pareada com etanol

Quando a primeira organização foi testada por teste  $t$  para medidas independentes, os seguintes resultados foram obtidos:

- a) CPE (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = 1,060$ ;  $gl = 22$ ;  $p = 0,301$ ;
- b) CNPE (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = 0,31$ ;  $gl = 22$ ;  $p = 0,976$ .

Nesse caso, a comparação dos grupos experimental e controle únicos por teste  $t$  não resultou em diferenças significativas em medidas independentes.

Quando esses mesmos dados foram organizados em 4 grupos (2 experimentais: E0750, E1030; 2 controles: C0750, C1030) segundo os intervalos de horário das 07:50 às 09:50 h e das 10:30 às 12:30 h, ANOVA mista 4x2 com grupos como fatores independentes e com câmaras (CPE e CNPE) como fatores repetidos resultou em diferença significativa na interação grupo x câmara ( $F = 3,432$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,037$ ;  $\eta^2 = 0,340$ ), mas não no efeito principal das câmaras ( $F = 0,370$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,550$ ;  $\eta^2 = 0,018$ ). Esses resultados da ANOVA indicam que quaisquer diferenças detectadas *post hoc* não podem ser atribuídas aos efeitos das câmaras de condicionamento *per se*, mas decorrem da interação entre tratamento e horário.

Comparações *post-hoc* por teste  $t$  para medidas independentes obtiveram os seguintes resultados:

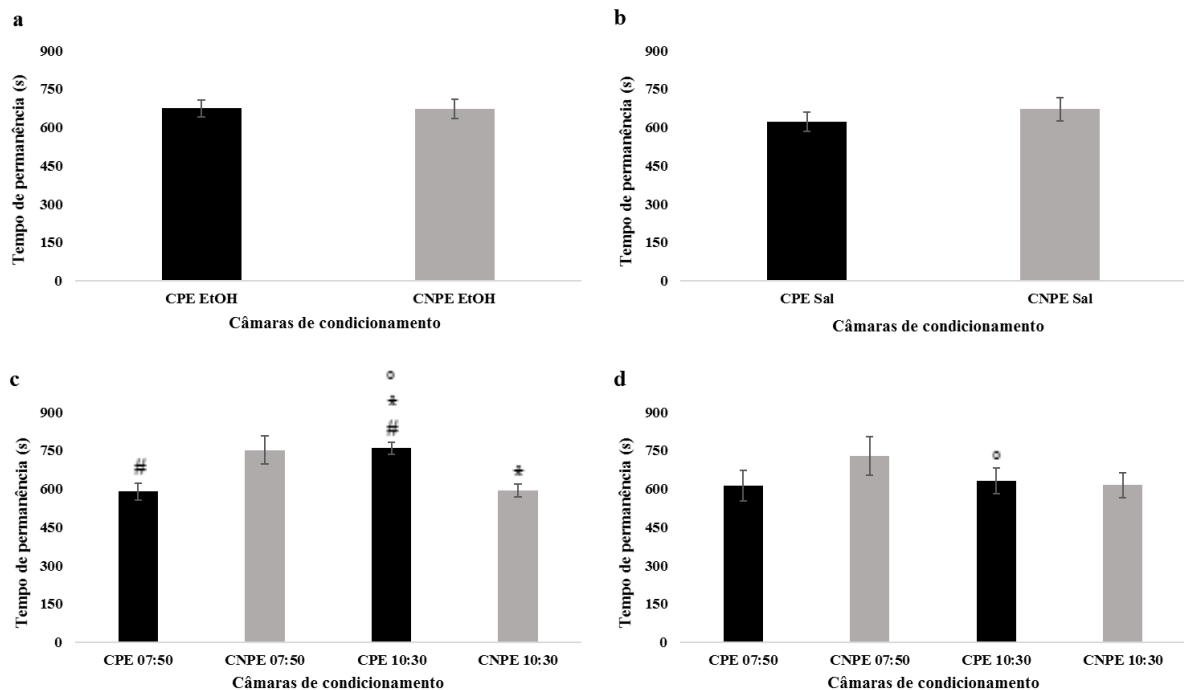
- a) CPE (E0750 vs. C0750):  $t = -0,351$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,733$ ;
- b) CNPE (E0750 vs. C0750):  $t = 0,255$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,804$ ;
- c) CPE (E1030 vs. C1030):  $t = 2,284$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,045$ ;
- d) CNPE (E1030 vs. C1030):  $t = -0,377$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,714$ ;
- e) CPE (E0750 vs. E1030):  $t = -4,295$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,002$ ;
- f) CNPE (E0750 vs. E1030):  $t = 2,572$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,028$ .

Já as comparações *post-hoc* por teste  $t$  para medidas repetidas obtiveram os seguintes resultados:

- a) E0750 (CPE vs. CNPE):  $t = -1,921$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,113$ ;
- b) C0750 (CPE vs. CNPE):  $t = -0,922$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,399$ ;
- c) E1030 (CPE vs. CNPE):  $t = 5,083$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,004$ ;
- d) C1030 (CPE vs. CNPE):  $t = 0,459$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,665$ .

Esses resultados *post hoc* para medidas independentes e repetidas indicam condicionamento de PCL somente no intervalo 10:30-12:30 h. Além disso, indicam tendência ao condicionamento de ACL no grupo E0750: comparação dos tempos de permanência na CPE e na CNPE entre os grupos E0750 e E1030 indicou diferenças significativas. Porém essa tendência no grupo E0750 não foi significativamente diferente da exibida pelo grupo C0750. A

Figura 2.2 apresenta os resultados dos grupos quando estes foram organizados de forma conjunta ou separada por horário, destacando as diferenças encontradas.



**Figura 2.2.** Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE segundo organização conjunta e separada dos dados dos animais tratados com etanol ou com salina dos experimentos 1 e 2. **2.2a**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante a sessão de teste do grupo experimental único (grupo experimental 0750-1230; n=12). **2.2b**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante a sessão de teste do grupo controle único (grupo controle 0750-1230; n=12). **2.2c**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante a sessão de teste dos grupos E0750 e E1030 (n=6 por grupo). **2.2c**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante a sessão de teste dos grupos C0750 e C1030 (n=6 por grupo). Barras indicam o escore de médio de cada grupo (escores médios  $\pm$  SE). **EtOH**, etanol; **Sal**, salina.

\* , na figura **2.2c**, indica diferença significativa ( $p=0,004$ ) segundo teste  $t$  para medidas repetidas (E1030: CPE vs. CNPE). ° , nas figuras **2.2c** e **2.2d**, indica diferença significativa ( $p=0,045$ ) segundo teste  $t$  para medidas independentes (E1030 vs. C1030, CPE). # , na figura **2.2c**, indica diferença significativa ( $p=0,002$ ) segundo teste  $t$  para medidas independentes (E0750 vs. E1030, CPE).

De forma a verificar o desenvolvimento do condicionamento ao longo da sessão de teste, intervalos cumulativos de 5 min (00:01-05:00; 00:01-10:00; 00:01-15:00; 00:01-20:00; 00:01-25:00 e 00:01-30:00 min) foram submetidos a teste  $t$  para medidas independentes. Os seguintes resultados significativos foram obtidos:

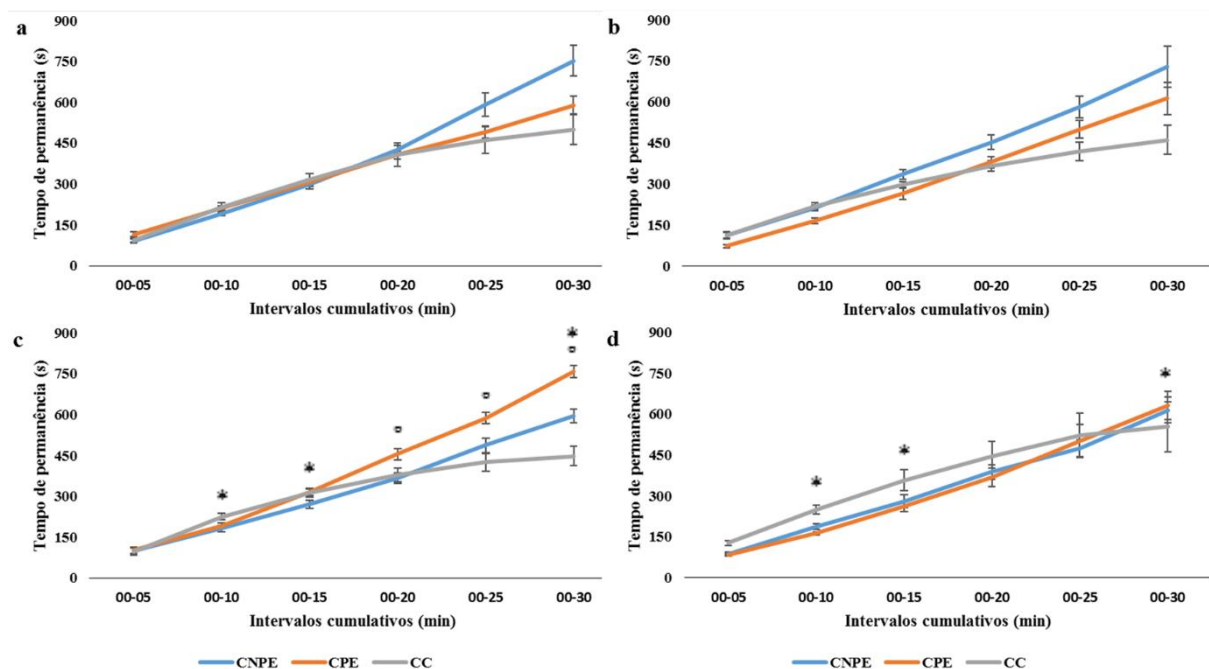
- a) intervalo 00:01-10:00 (CPE, E1030 vs. C1030):  $t = 2,302$ ; gl = 10;  $p = 0,044$ ;
- b) intervalo 00:01-15:00 (CPE, E1030 vs. C1030):  $t = 2,359$ ; gl = 10;  $p = 0,04$ ;
- c) intervalo 00:01-30:00 (CPE, E1030 vs. C1030):  $t = 2,284$ ; gl = 10;  $p = 0,045$ ;
- d) intervalo 00:01-20:00 (CNPE, E0750 vs. E1030):  $t = -2,509$ ; gl = 10;  $p = 0,031$ ;
- e) intervalo 00:01-25:00 (CPE, E0750 vs. E1030):  $t = -3,292$ ; gl = 10;  $p = 0,008$ ;
- f) intervalo 00:01-30:00 (CPE, E0750 vs. E1030):  $t = -4,295$ ; gl = 10;  $p = 0,002$ ;
- g) intervalo 00:01-30:00 (CNPE, E0750 vs. E1030):  $t = -2,572$ ; gl = 10;  $p = 0,028$ .



Já a análise dos intervalos cumulativos por teste *t* para medidas repetidas obteve os seguintes resultados significativos:

- a) intervalo 00:01-20:00 (E1030, CPE vs. CNPE):  $t = -2,823$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,037$ ;
- b) intervalo 00:01-25:00 (E1030, CPE vs. CNPE):  $t = -3,094$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,027$ ;
- c) intervalo 00:01-30:00 (E1030, CPE vs. CNPE):  $t = -5,083$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,004$ .

Esses resultados indicam desenvolvimentos diferentes dos tempos de permanência na CPE e na CNPE em relação à câmara central (CC), sendo que as curvas CPE e CNPE divergiram entre o décimo e décimo quinto min do teste no grupo E1030. Por outro lado, todos os 4 últimos intervalos cumulativos analisados no grupo E1030 apresentaram diferenças significativas em medidas repetidas (intervalos 00-20, 00-25 e 00-30 min) e em medidas independentes (intervalos 00-10, 00-15 e 00-30 min), mas somente o último intervalo apresentou ambas as diferenças (00-30 min). Além disso, há desenvolvimentos temporais diferentes dos efeitos do condicionamento ao longo da sessão de teste nos horários das 07:50 às 09:50 h e das 10:30 às 12:30 h. A Figura 2.3 apresenta os resultados em forma de curvas cumulativas dos tempos médios de permanência na CC, na CPE e na CNPE, destacando as diferenças encontradas no grupo experimental e entre os grupos experimental e controle.



**Figura 2.3.** Tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC na sessão de teste segundo intervalos cumulativos de 5 minutos.

Dados cumulativos do tempo de permanência no compartimento pareado com etanol (CPE), no compartimento não pareado com etanol (CNPE) e no compartimento central (CC) nos grupos E0750 (período 07:50-09:50 h), E1030 (período 10:30-12:30 h), C0750 (período 07:50-09:50 h) e C1030 (período 10:30-12:30 h). Curvas construídas a partir da organização dos dados em intervalos cumulativos de cinco minutos (escores médios  $\pm$  SE).

**2.3a**, curvas cumulativas médias de tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC do grupo E0750; **2.3b**, curvas cumulativas médias de tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC do grupo C0750; **2.3c**, curvas cumulativas

médias de tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC do grupo E1030; **2.3d**, curvas cumulativas médias de tempo de permanência nas CPE, CNPE e CC do grupo C1030.

°, na figura **2.3c**, indica diferenças significativas no vigésimo, no vigésimo quinto e no trigésimo minuto (respectivamente,  $p=0,037$ ,  $p=0,027$  e  $p=0,004$ ) segundo teste  $t$  para medidas repetidas (E1030, CPE vs. CNPE).

\*, nas figuras **2.3c** e **2.3d**, indica diferenças significativas no décimo, no décimo quinto e no trigésimo minuto (respectivamente,  $p=0,044$ ,  $p=0,040$  e  $p=0,045$ ) segundo teste  $t$  para medidas independentes (CPE, E1030 vs. C1030).

## 4.2 EXPERIMENTOS 3 E 4

Tal como no caso dos experimentos 1 e 2, os dados dos experimentos 3 e 4 foram organizados de duas maneiras para a análise estatística. Na primeira organização, os dados foram agrupados como constituindo somente dois grupos ( $n = 16$  por grupo): grupo experimental 0750-1230 (E0750-1230) e grupo controle 0750-1230 (C0750-1230). Na segunda organização, esses mesmos dados foram divididos em 4 grupos (2 experimentais: E0750, E1030; 2 controles: C0750, C1030) segundo os intervalos de horário das 07:50 às 09:50 h e das 10:30 às 12:30 h. A Tabela 2.3 exhibe os resultados do teste de normalidade dos grupos segundo as duas organizações.

**Tabela 2.3**

Teste de normalidade dos experimentos 3 e 4.

Organizações		Casos				Teste de Shapiro-Walk			
Grupos	Câmaras		Válidos		Ausentes		Estatística	gl	Significância
	LB	Teste	N	Porcentagem	N	Porcentagem			
E0750-1230	CPE		16	100%	0	0%	0,938	16	0,327
E0750-1230	CNPE		16	100%	0	0%	0,904	16	0,092
E0750-1230		CPE	16	100%	0	0%	0,983	16	0,984
E0750-1230		CNPE	16	100%	0	0%	0,914	16	0,137
C0750-1230	CPE		16	100%	0	0%	0,960	16	0,661
C0750-1230	CNPE		16	100%	0	0%	0,907	16	0,103
C0750-1230		CPE	16	100%	0	0%	0,963	16	0,717
C0750-1230		CNPE	16	100%	0	0%	0,968	16	0,809
E0750	CPE		8	100%	0	0%	0,946	8	0,669
E0750	CNPE		8	100%	0	0%	0,819	8	0,046
E0750		CPE	8	100%	0	0%	0,980	8	0,961
E0750		CNPE	8	100%	0	0%	0,935	8	0,566
C0750	CPE		8	100%	0	0%	0,988	8	0,992
C0750	CNPE		8	100%	0	0%	0,949	8	0,704
C0750		CPE	8	100%	0	0%	0,938	8	0,596
C0750		CNPE	8	100%	0	0%	0,949	8	0,696
E1030	CPE		8	100%	0	0%	0,921	8	0,440
E1030	CNPE		8	100%	0	0%	0,979	8	0,956
E1030		CPE	8	100%	0	0%	0,957	8	0,785
E1030		CNPE	8	100%	0	0%	0,886	8	0,212
C1030	CPE		8	100%	0	0%	0,949	8	0,703
C1030	CNPE		8	100%	0	0%	0,678	8	0,001
C1030		CPE	8	100%	0	0%	0,824	8	0,061
C1030		CNPE	8	100%	0	0%	0,912	8	0,368

**Nota:** LB, linha de base; gl, grau de liberdade; N, número; CPE, câmara pareada com etanol; CNPE, câmara não pareada com etanol.

Como pode ser visto na Tabela 2.3, a primeira organização apresentou distribuição normal. Já no caso da segunda organização, somente o tempo de permanência na CNPE durante a linha de base dos grupos E0750 e C1030 não apresentou distribuição normal. Tendo em vista que (a) a frequência de falhas de normalidade é baixa nos dados dos experimentos 3 e 4, que (b) as falhas ocorreram nos tempos de permanência na CNPE e somente na linha de base, que (c) a ANOVA não é considerada muito sensível a desvios moderados de normalidade, e que (c) estudos de simulação, usando uma variedade de distribuições não normais, mostraram que a taxa de falsos positivos é minimamente afetada pela violação da assunção de distribuição normal (Glass, Peckham, & Sanders, 1972; Harwell, Rubinstein, Hayes, & Olds, 1992; Lix, Keselman, & Keselman, 1996; para outras considerações e contra-argumentos, ver Dixon, 2008), tais falhas de normalidade não impedem a aplicação de testes paramétricos nos dados dos experimentos 3 e 4.

Quando a primeira organização foi testada por teste  $t$  para medidas independentes, as diferenças entre os grupos experimental e controle resultaram não significativas:

- a) CPE linha de base (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = 0,296$ ;  $gl = 30$ ;  $p = 0,769$ ;
- b) CNPE linha de base (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = -0,296$ ;  $gl = 30$ ;  $p = 0,769$ ;
- c) CPE teste (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = -1,694$ ;  $gl = 30$ ;  $p = 0,101$ ;
- d) CNPE teste (E0750-1230 vs. C0750-1230):  $t = 0,511$ ;  $gl = 30$ ;  $p = 0,613$ .

Quando a organização foi testada por teste  $t$  para medidas repetidas, as diferenças também resultaram não significativas:

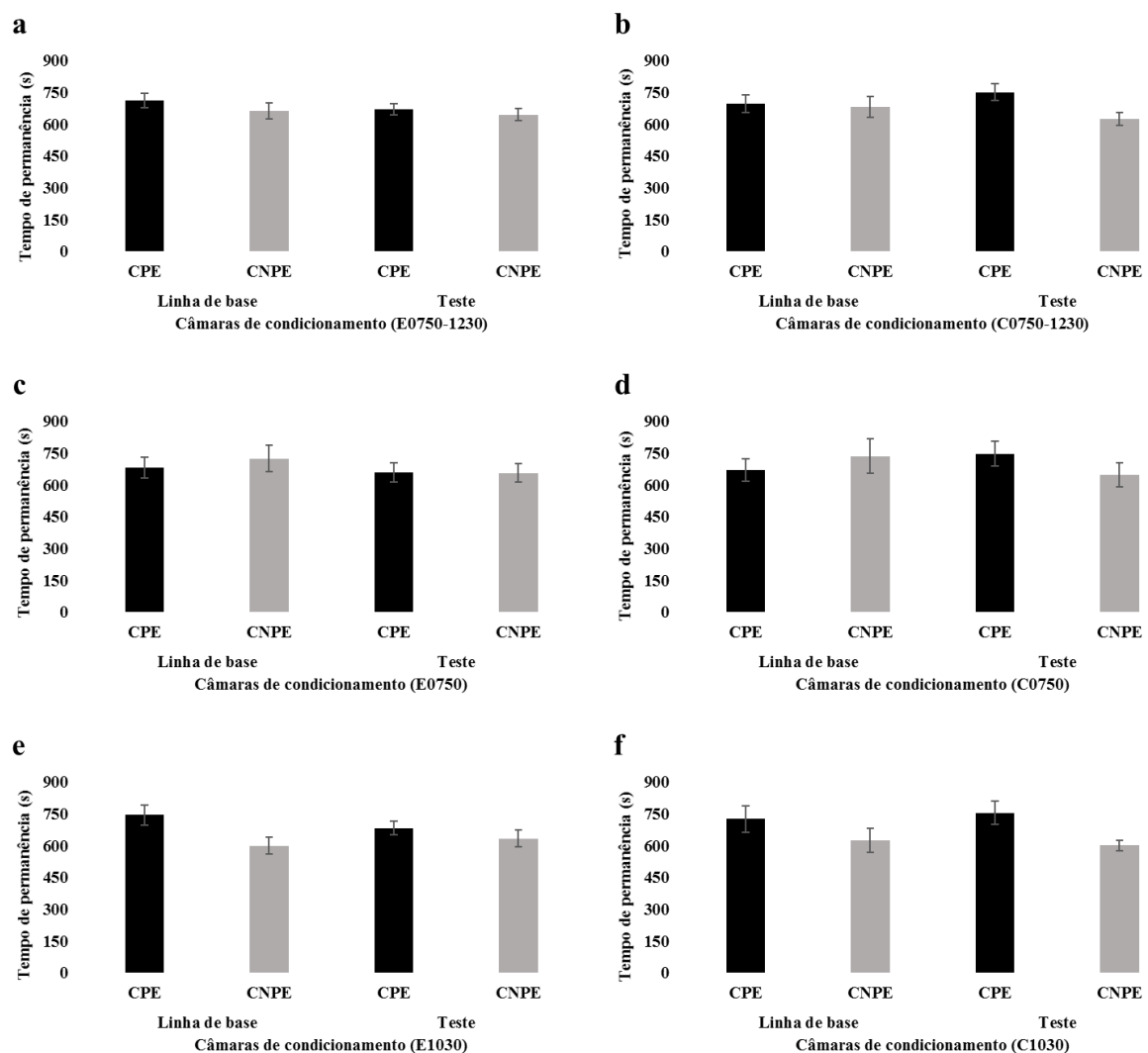
- a) E0750-1230 linha de base (CPE vs. CNPE):  $t = 0,745$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,468$ ;
- b) C0750-1230 linha de base (CPE vs. CNPE):  $t = 0,202$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,842$ ;
- c) E0750-1230 teste (CPE vs. CNPE):  $t = 0,495$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,628$ ;
- d) C0750-1230 teste (CPE vs. CNPE):  $t = 1,948$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,07$ ;
- e) E0750-1230 (CPE linha de base vs. CPE teste):  $t = 0,918$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,373$ ;
- f) E0750-1230 (CNPE linha de base vs. CNPE teste):  $t = 0,349$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,732$ ;
- g) C0750-1230 (CPE linha de base vs. CPE teste):  $t = -1,200$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,249$ ;
- h) C0750-1230 (CNPE linha de base vs. CNPE teste):  $t = 1,110$ ;  $gl = 15$ ;  $p = 0,285$ ;

Esses resultados *post hoc* para medidas independentes e repetidas corroboram os resultados da análise conjunta realizada para os experimentos 1 e 2, indicando que a organização conjunta de dados obtidos no período de 07:50 às 12:30 h não é a melhor forma de se analisar os dados.

Quando esses mesmos dados foram organizados em quatro grupos (2 experimentais: E0750, E1030; 2 controles: C0750, C1030) segundo os intervalos de horário (das 07:50 às 09:50

h e das 10:30 às 12:30 h), ANOVA mista 4x4, com grupos como fatores independentes e com tempos (CPE linha de base, CNPE linha de base, CPE teste, CNPE teste) como fatores repetidos, resultou em diferenças não significativas no efeito principal do tempo ( $F = 1,510$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,218$ ) e na interação grupo x tempo ( $F = 0,818$ ;  $gl = 9$ ;  $p = 0,601$ ).

Esses resultados indicam efeitos de inibição latente sobre o condicionamento. Quando o protocolo de MCL empregado não possui fase de linha de base, condicionamento de PCL ocorre no intervalo de 10:30 às 12:30 h (experimento 2). Quando fase de linha de base é adicionada ao protocolo de MCL no intervalo de 10:30 às 12:30 h, mantendo-se demais variáveis nos mesmos parâmetros, obtém-se falha de condicionamento (experimento 4). Além disso, os resultados também corroboram a inadequação de uso do período de 07:50 às 09:50 h para o condicionamento ao local com etanol: ambos experimentos 3 e 4, realizados nesse horário, resultaram em falha de condicionamento. A Figura 2.4 apresenta os dados dos tempos médios de permanência na CPE e na CNPE nos experimentos 3 e 4 para os grupos experimentais e controles, organizados segundo as duas maneiras diferentes.



**Figura 2.4.** Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE segundo organização conjunta e em separado dos dados dos animais tratados com etanol ou com salina dos experimentos 3 e 4.

**2.4a**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo experimental único (E0750-1230; n=16); **2.4b**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo controle único (C0750-1230; n=16); **2.4c**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo E0750 (n=8); **2.4d**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo C0750 (n=8); **2.4e**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo E1030 (n=8); **2.4f**, tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste do grupo C1030 (n=8).

Barras indicam o escore de médio de cada grupo (escores médios  $\pm$  SE).

### 4.3 EXPERIMENTO 5

A Tabela 2.4 exibe os resultados do teste de normalidade dos grupos do experimento 5. Como pode ser visto na referida tabela, apenas 1 dos 8 tempos de permanência apresentou distribuição não-normal: linha de base do grupo C1030 na CNPE. Tal qual o caso dos experimentos 3 e 4, essa baixa frequência de falha de normalidade nos dados do experimento 5 não impede a aplicação de teste paramétrico para análise de dados.

**Tabela 2.4**

Teste de normalidade do experimento 5.

Organizações		Casos				Teste de Shapiro-Walk			
Grupo	Câmaras		Válidos		Ausentes		Estatística	gl	Significância
	LB	Teste	N	Porcentagem	N	Porcentagem			
E1030	CPE		7	100%	0	0%	0,984	7	0,976
E1030	CNPE		7	100%	0	0%	0,908	7	0,380
E1030		CPE	7	100%	0	0%	0,838	7	0,096
E1030		CNPE	7	100%	0	0%	0,844	7	0,246
C1030	CPE		7	100%	0	0%	0,849	7	0,121
C1030	CNPE		7	100%	0	0%	0,771	7	0,021
C1030		CPE	7	100%	0	0%	0,980	7	0,961
C1030		CNPE	7	100%	0	0%	0,929	7	0,539

**Nota:** LB, linha de base; gl, grau de liberdade; N, número; CPE, câmara pareada com etanol; CNPE, câmara não pareada com etanol.

Quando os dados dos grupos do experimento 5 foram comparados por ANOVA mista 2x4, com grupos (E1030 e C1030) como fatores independentes e tempos (CPE linha de base, CNPE linha de base, CPE teste, CNPE teste) como fatores repetidos. A comparação resultou em diferença significativa na interação grupo vs. tempos ( $F = 3,763$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,019$ ;  $\eta^2 = 0,239$ ), mas não no efeito principal do tempo ( $F = 2,740$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,57$ ;  $\eta^2 = 0,186$ ). O resultado da ANOVA para efeito principal do tempo indica que as diferenças encontradas não advêm de diferenças entre as câmaras de condicionamento na linha de base entre os grupos. Além disso, o resultado de diferença significativa na interação grupo vs tempos indica que as diferenças são decorrentes dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre o tempo de permanência nas câmaras de condicionamento durante o teste.

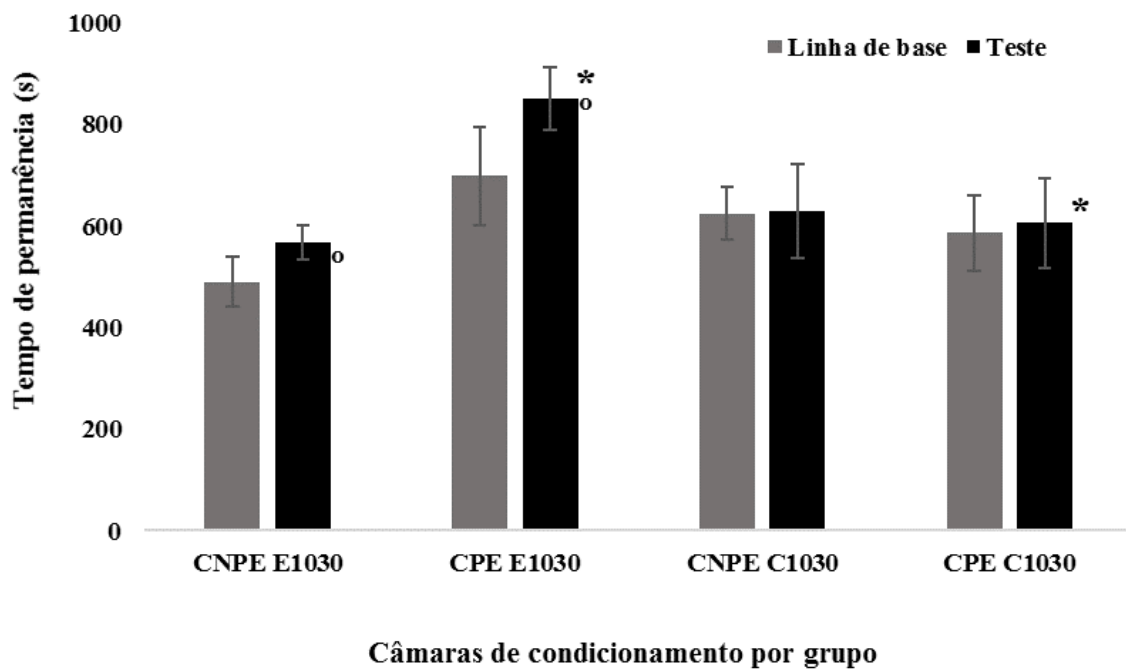
Quando os grupos foram submetidos a comparações *post-hoc* por teste *t* para medidas independentes, os seguintes resultados foram obtidos:

- a) CPE linha de base (E1030 vs. C1030):  $t = -0,922$ ;  $gl = 12$ ;  $p = 0,375$ ;
- b) CNPE linha de base (E1030 vs. C1030):  $t = 1,902$ ;  $gl = 12$ ;  $p = 0,081$ ;
- c) CPE teste (E1030 vs. C1030):  $t = -2,257$ ;  $gl = 12$ ;  $p = 0,043$ ;
- d) CNPE teste (E1030 vs. C1030):  $t = 0,610$ ;  $gl = 12$ ;  $p = 0,553$ .

Comparações *post-hoc* por teste *t* para medidas repetidas obtiveram os seguintes resultados:

- a) E1030 linha de base (CPE vs. CNPE):  $t = -1,954$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,099$ ;
- b) C1030 linha de base (CPE vs. CNPE):  $t = 0,550$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,602$ ;
- c) E1030 teste (CPE vs. CNPE):  $t = -3,156$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,020$ ;
- d) C1030 teste (CPE vs. CNPE):  $t = 0,182$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,862$ .

Esses resultados *post hoc* indicam que o aumento de 24 para 48 h dos intervalos interfásicos linha de base-condicionamento e condicionamento-teste e dos intervalos entre sessões de condicionamento é capaz de contornar os efeitos da inibição latente e restabelecer o produção de PCL no horário das 10:30 às 12:30 h. A Figura 2.5 apresenta os dados dos tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste dos grupos experimental (E1030) e controle (C1030) no experimento 5, destacando as diferenças significativas encontradas.



**Figura 2.5.** Tempos médios de permanência na CPE e na CNPE durante as sessões de linha de base e de teste dos animais tratados com etanol ou com salina do experimento 5.

\*, indica diferença significativa nos tempos de permanência na CPE durante a sessão de teste entre o grupo experimental e controle (teste *t* para medidas independentes,  $p = 0,043$ ). °, indica diferença significativa entre os tempos de permanência na CPE e na CNPE durante a sessão de teste (teste *t* para medidas repetidas,  $p = 0,02$ ).

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos 1 e 2 corroboram os resultados de PCL anteriormente obtidos por Morales *et al.* (2012) utilizando protocolo de condicionamento sem linha de base no período das 10:00 às 11:00 h. O protocolo de MCL aplicado nos grupos E1030 e C1030 ocorreu 3 h e meia após o início da fase clara do ciclo claro-escuro e se estendeu por mais 2 h. Morales *et al.* (2012) realizaram seus experimentos a partir de 4 h após o início da fase clara, os quais se estenderam por mais 1 h, período esse englobado pelo horário utilizado nesse estudo. Ademais, a análise indica que quando os dados destes períodos (07:50-09:50 h e 10:30-12:30 h) são interpretados como pertencendo à mesma categoria (caso das Figuras 2.1a e 2.1b), há possibilidade de não se detectar efetividade do condicionamento. Esses resultados podem explicar as falhas de condicionamento reportadas por Busse e Riley (2002) e Busse *et al.* (2004) e, ao menos em parte, o condicionamento de ACL relatado por Busse *et al.* (2005). Esses pesquisadores realizaram seus experimentos a partir de 1 h após o início da fase clara e os mesmos se estenderam por mais 5 ou 7 h (no primeiro caso: Busse & Riley, 2002; Busse *et al.*, 2005; no segundo: Busse *et al.*, 2004), mas não diferenciaram os horários. Ainda assim, deve ser enfatizado que tanto Morales *et al.* (2012) quanto o grupo de Busse utilizaram via de administração (intraperitoneal) e doses de etanol (0,5 e 1,5 g/kg) diferentes das empregadas nesse estudo. Além disso, o grupo de Busse utilizou alocação individual, enquanto a alocação grupal foi utilizada tanto nesse estudo quanto em Morales *et al.* (2012).

Levando-se em conta essas ressalvas, quando são tomados em conjunto os dados de Morales *et al.* (2012), de Busse *et al.* (2005) e os dados dos experimentos 1 e 2 realizados nesse estudo, a análise indica interação entre o sistema de alocação e o horário no qual experimentos sem fases de habituação foram realizados: (a) quando a alocação individual é utilizada e o condicionamento ocorre entre as 07:50 e as 09:50 h, há maiores chances de obtenção de ACL; (b) quando alocação individual é utilizada e o condicionamento ocorre entre as 10:30 e as 12:30 h, há maiores chances de falha de condicionamento; (c) quando a alocação grupal é utilizada e o condicionamento ocorre entre as 07:50 e as 09:50 h, há maiores chances de falha de condicionamento; (d) quando a alocação grupal é utilizada e o condicionamento ocorre entre as 10:30 e as 12:30 h, há maiores chances de condicionamento de PCL.

No caso da análise temporal das curvas cumulativas de tempo de permanência, anteriormente foi demonstrado que, no grupo E1030 do experimento 2, há o desenvolvimento de diferentes curvas para a CPE a CNPE em relação à CC, sendo que as curvas CPE e CNPE divergiram entre si a partir do décimo e do décimo quinto min do teste. Também foi demonstrado anteriormente que em todos os 4 últimos intervalos cumulativos analisados no grupo E1030, diferenças significativas foram encontradas em medidas repetidas (intervalos 00-20, 00-25 e 00-30 min) e em medidas independentes (intervalos 00-10, 00-15 e 00-30 min), sendo que apenas o último intervalo apresentou ambas diferenças (00-30 min). Este padrão não foi encontrado nos demais grupos e o mesmo pode ser característico de protocolos experimentais que utilizem administração intragástrica e resultem em condicionamento efetivo (isto é, que apresentem ambas as diferenças num mesmo *locus* temporal, caso do intervalo de 00-30 min). Esse resultado demanda maior cautela na interpretação de dados advindos de testes cuja duração seja menor que este intervalo. Por exemplo, Bedingfield *et al.* (1999) utilizaram administração por gavagem e sessão de teste com duração de 20 min e não obtiveram resultados significativos. Em acordo com esses dados, as diferenças detectadas entre os grupos E0750 e E1030 dos experimentos 1 e 2 surgiram a partir do vigésimo min do teste. Assim, quando implementada administração intragástrica, tal ocorrência indica que testes com menores durações que 20-30 min não são adequados à detecção de variabilidade circadiana na efetividade de protocolos de condicionamento.

No que se refere aos experimentos 3 e 4, os resultados não significativos da comparação por ANOVA indicam tanto que o aparato utilizado nesse estudo não possui viés, quanto os efeitos da inibição latente sobre o condicionamento com etanol no MCL. No segundo caso, esses resultados também corroboram os resultados obtidos por Morales *et al.* (2012) quando esses pesquisadores utilizaram protocolo de condicionamento associado com uma sessão de habituação no horário de 10:00 às 11:00 h. Além disso, a comparação com os resultados advindos do emprego de protocolos  $C \leq 10$  (4 ou 8 sessões) associados com uma sessão de habituação ou de linha de base (com intervalo interfásico de 24 h) obtidos por Al Ameri *et al.* (2014), Alaux-Cantin *et al.* (2013) e Morales *et al.* (2012) com via de administração intraperitoneal, sugere que a via intragástrica é mais sensível aos efeitos da inibição latente que a via de administração intraperitoneal. Por exemplo, desses estudos citados, apenas Morales *et al.* (2012) reportou falha de condicionamento consistente a partir de efeitos de inibição latente, ainda que tenha dado outra explicação aos seus resultados. Mas nesse caso só 4 sessões de condicionamento foram utilizadas, enquanto que nos demais estudos 8 sessões de condicionamento foram aplicadas, tal qual nesse estudo. Dado que Al Ameri *et al.* (2014) e



Alaux-Cantin *et al.* (2013) obtiveram PCL utilizando dose de 0,5 g/kg administrada intraperitonealmente, há possibilidade de que tal maior sensibilidade à inibição latente seja verídica.

Com relação ao resultado do experimento 5, quando comparado com o resultado do experimento 4, o condicionamento de PCL indica que o aumento da duração dos intervalos interfásicos e entre sessões é capaz de diminuir os efeitos de inibição latente no horário das 10:30 às 12:30 h. Além disso, esse resultado corrobora os achados de Black *et al.* (1973). Esses pesquisadores reportaram PCL em 2 experimentos realizados com este protocolo, empregando um aparato de duas câmaras e via intraperitoneal de administração (dose de 1g/kg). Até onde nossa revisão da literatura permite afirmar, esta é a primeira replicação dos achados de Black *et al.* (1973), utilizando o mesmo protocolo por eles empregados, isto é, experimentos sem fase de habituação, fase de linha de base com sessão única, fase de condicionamento com 8 sessões e fase de teste com sessão única, sendo de 48 h os intervalos interfásicos e entre sessões. Todavia, o fato daqueles autores não terem reportado o horário no qual realizaram os experimentos, de suas sessões de linha de base e teste durarem apenas 15 min (as desse estudo duraram 30 min), acrescidas as diferenças de aparato e de via de administração, nos demandam cautela na comparação direta dos dados daqueles autores com os nossos. Ainda assim, levando-se em conta as necessárias ressalvas, quando tomados em conjunto, os dados dos experimentos aqui reportados, de Black *et al.* (1973), de Morales *et al.* (2012), de Busse e Riley (2002), de Busse *et al.* (2004; 2005), de Bedingfield *et al.* (1999), de Patkina e Zvartau (1998) e de Bagrov *et al.* (1999), esses apontam para fatores circadianos e de *massed e spaced conditioning* como preponderantes à efetividade do condicionamento ao local induzido por etanol em ratos segundo a administração intragástrica por gavagem.

Adicionalmente, a análise dos resultados dos experimentos 1 ao 5 não corrobora a explicação dada por Morales *et al.* (2012) acerca da diferença de resultados obtidos por aqueles pesquisadores em experimentos com protocolos de condicionamento associados ou não com sessão de habituação a partir de 4 h após o início da fase clara. Morales *et al.* (2012) interpretaram as diferenças como advindas de processos comportamentais relacionados com os efeitos estressores de contato com ambiente novo: dado que o etanol possui efeitos ansiolíticos, esse efeito poderia ser maior em situações de contato com ambiente novo, reduzindo assim o estresse gerado por esse contato. Isso poderia explicar o condicionamento de PCL no protocolo de MCL sem fase de habituação e/ou de linha de base e a falha de condicionamento quando essas fases estão presentes, ambos resultados reportados por Morales *et al.* (2012) e aqui replicados nos experimentos 2 e 4. Todavia, frente ao condicionamento de PCL no experimento

5, essa interpretação não parece ser adequada e as obtenções de PCL e de falhas de condicionamento reportadas por Morales *et al.* (2012) e aqui nos experimentos 2, 4 e 5 são mais facilmente interpretadas segundo interações entre efeitos de inibição latente e de efeitos do espaçamento entre fases e entre sessões no MCL com etanol em ratos.

Finalmente, quando considerados em conjunto os resultados dos experimentos 1 ao 5, esses apontam que condicionamento de PCL é possível em aparatos de 75 cm de comprimento e 40 cm de largura. Além disso, o conjunto dos resultados também indicam interações entre (a) modulação circadiana, (b) inibição latente e (c) intervalos interfásicos e entre sessões no MCL com etanol por via intragástrica: (1) quando o protocolo de MCL não possui fase de habituação, o condicionamento por via intragástrica em protocolo curto de condicionamento só ocorre no período das 10:30 às 12:30 h; (2) quando o protocolo de MCL possui fase de habituação, o condicionamento por via intragástrica em protocolo curto de condicionamento é abolido no período das 10:30 às 12:30 h; (3) quando o protocolo de MCL possui fase de habituação e há o aumento de 24 para 48 h dos intervalos interfásicos habituação-condicionamento e condicionamento-teste e dos intervalos entre as sessões de condicionamento em protocolo curto de condicionamento, os efeitos do condicionamento são restabelecidos no período das 10:30 às 12:30 h. A realização de experimentos no mesmo aparato, nos mesmos horários e segundo os mesmos protocolos de MCL, mas que utilizem a via intraperitoneal é necessária à compreensão de quão extensos são esses efeitos no MCL com etanol em ratos.

## Referências

- Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M., & Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59(2), 253-277.
- Al Ameri, M., Al Mansouri, S., Al Maamari, A., & Bahi, A. (2014). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid reduces ethanol consumption e ethanol-conditioned place preference in rats. *Brain Research*, 1583,122-131.
- Alaux-Cantin, S., Warnault, V., Legastelois, R., Botia, B., Pierrefiche, O., Vilpoux, C., & Naassila, M. (2013). Alcohol intoxications during adolescence increase motivation for alcohol in adult rats and induce neuroadaptations in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, 67, 521-531.
- Arakawa, H. (2003). The effects of isolation rearing on open-field behavior in male rats depends on developmental stages. *Developmental psychobiology*, 43(1), 11-19.
- Arakawa, H. (2005). Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behavioural Processes*, 70, 223-234.
- Asin, K. E., Wirtshafter, D. & Tabakoff, B. (1985). Failure to establish a conditioned place preference with ethanol in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 22, 169-173.
- Bagrov, Y. Y., Dmitrieva, N. I., Manusova, N. B., Zvartau, E. E., Patkina, N. A., & Bagrov, A. Y. (1999). Involvement of endogenous digitalis-like factors in voluntary selection of alcohol by rats. *Life Sciences*, 64, PL219-PL225.
- Bahi, A. (2013). Viral-mediated knockdown of mGluR7 in the nucleus accumbens mediates excessive alcohol drinking and increased ethanol-elicited conditioned place preference in rats. *Neuropsychopharmacology*, 38, 2109-2119.
- Bahi, A., Dreyer, J.-L. (2013). Striatal modulation of BDNF expression using microRNA124a-expressing lentiviral vectors impairs ethanol-induced conditioned-place preference and voluntary alcohol consumption. *European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2328-2337.
- Bahi, A., Dreyer, J.-L. (2014). Lentiviral vector-mediated dopamine D3 receptor modulation in the rat brain impairs alcohol intake and ethanol-induced conditioned place preference. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(9), 2369-2376.
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: What does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31-43.

- Bardo, M. T., Rowlett, J. K., & Harris, M. J. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: A meta-analysis. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 19(1), 39-51.
- Barbier, E., Pierrefiche, O., Vaudry, D., Vaudry, H., Daoust, M., & Naassila, M., (2008). Long-term alterations in vulnerability to addiction to drugs of abuse and in brain gene expression after early life ethanol exposure. *Neuropharmacology*, 55, 1199-1211.
- Becker, A., Schmitz, M., & Grecksch, G. (2006). Kindling modifies morphine, cocaine and ethanol place preference. *Experimental Brain Research*, 168, 33-40.
- Bedingfield, J. B., King, D. A., & Holloway, F. A. (1999). Peripheral opioid receptors may mediate a portion of the aversive and depressant effect of EtOH: CPP and locomotor activity. *Alcohol*, 18(2-3), 93-101.
- Biała, G., & Kotlinska, J. (1999). Blockade of the acquisition of ethanol-induced conditioned place preference by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Alcohol and Alcoholism*, 34, 175-182.
- Biała, G., & Langwiński, R. (1996a). Effects of calcium channel antagonists on the reinforcing properties of morphine, ethanol and cocaine as measured by place conditioning. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 47, 497-502.
- Biała, G., & Langwiński, R. (1996b). Rewarding properties of some drugs studied by place preference conditioning. *Polish Journal of Pharmacology*, 48, 425-430.
- Bie, B., Zhu, W., & Pan, Z. Z. (2009). Ethanol-induced delta-opioid receptor modulation of glutamate synaptic transmission and conditioned place preference in central amygdala. *Neuroscience*, 160, 348-358.
- Bieńkowski, P., Iwinska, K., Piasecki, J., & Kostowski, W. (1997). 5,7-Dihydroxytryptamine lesion does not affect ethanol-induced conditioned taste and place aversion in rats. *Alcohol*, 14, 439-443.
- Bieńkowski, P., Kuca, P., & Kostowski, W. (1995). Conditioned place preference after prolonged pre-exposure to ethanol. *Polish Journal of Pharmacology*, 47, 189-191.
- Bieńkowski, P., Kuca, P., Piasecki, J., & Kostowski, W. (1996). Low-dose ethanol induces conditioned place preference in rats after repeated exposures to ethanol or saline injections. *Alcohol and Alcoholism*, 31, 547-553.
- Bieńkowski, P., Kuca, P., Piasecki, J., & Kostowski, W. (1997). 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, tropisetron, does not influence ethanol-induced conditioned taste aversion and conditioned place aversion. *Alcohol*, 14, 63-69.

- Bitterman, M. E. (1965). The CS-US interval in classical and avoidance conditioning. In W. F. Prokasy (Ed.), *Classical conditioning* (pp. 1-19). Nova York, NY: Appleton-Century-Crofts.
- Black, R. W., Albinak, T., Davis, M., & Schumpert, J. (1973). A preference in rats for cues associated with intoxication. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 2, 423-424.
- Bode, J. C. (1980). Alcohol and the gastrointestinal tract. In P. Frick, G.-A. von Harnack, G. A. Martini & A. Prader (eds.), *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde*, vol. 45 (pp. 1-75). Berlin, Alemanha: Springer-Verlag.
- Bormann, N. M., & Cunningham, C. L. (1997). The effects of naloxone on expression and acquisition of ethanol place conditioning in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58(4), 975-982.
- Bormann, N. M., & Cunningham, C. L. (1998). Ethanol-conditioned place aversion in rats: Effect of interstimulus interval. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59, 427-432.
- Bozarth, M. A. (1987). Conditioned place preference: A parametric analysis using systemic heroin injections. In M. A., Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 241-273). New York, NY: Springer-Verlag.
- Bozarth, M. A. (1990) Evidence for the rewarding effects of ethanol using the conditioned place preference Method. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 35, 485-487.
- Busse, G. D., & Riley, A. L. (2002). Modulation of cocaine-induced place preferences by alcohol. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26 (7-8), 1373-1381.
- Busse, G. D., Lawrence, E. T., & Riley, A. L. (2004). The modulation of cocaine-induced conditioned place preferences by alcohol: effects of cocaine dose. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28, 149-155.
- Busse, G. D., Lawrence, E. T., & Riley, A. L. (2005). The effects of alcohol preexposure on cocaine, alcohol and cocaine/alcohol place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 81, 459-465.
- Buhr, E. D., Yoo, S.-H., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330, 379-385.
- Carboni, E., & Vacca, C. (2003). Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. In J. Q. Wang (Ed.), *Drugs of Abuse: Neurological Reviews and Protocols (Methods in Molecular Medicine*, vol. 79, pp. 481-498). Totowa, NJ: Humana Press.

- Carlezon, W. A. (2003) Place conditioning to study drug reward and aversion. In Z. Z. Pan (Ed.), *Opioid Research: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine, Vol. 84)*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: Comportamento, linguagem and cognição* (4ª ed., D. G. de Souza, Trad.). Porto Alegre: Artmed.
- Ciccocioppo, R., Panocka, I., Froidi, R., Quitadamo, E., & Massi, M. (1999). Ethanol induces conditioned place preference in genetically selected alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 141, 235-241.
- Ciccocioppo, R., Panocka, I., Polidori, C., Regoli, D., & Massi, M. (1999). Effect of Nociceptin in alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology*, 141, 220-224.
- Cole, J. C., Sumnall, H. R., O'Shea, E., & Marsden, C. A. (2003). Effects of MDMA exposure on the conditioned place preference produced by other drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl)*, 166, 383-390.
- Cossio-Bolaños, M., Campos, R. G., Vitória, R. V., Fogaça, R. T. H., & de Arruda, M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2151-2156.
- Cunningham, C. L. (1981). Spatial aversion conditioning with ethanol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 14, 263-264.
- Cunningham, C. L., & Niehus, J. S. (1993). Drug-induced hypothermia and conditioned place aversion. *Behavioral Neuroscience*, 107, 468-479.
- Cunningham, C. L., Niehus, J. S., & Noble, D. (1993). Species difference in sensitivity to ethanol's hedonic effects. *Alcohol*, 10, 97-102.
- Danel, T., & Touitou, Y. (2004). Chronobiology of alcohol: From chronokinetics to alcohol-related alterations of the circadian system. *Chronobiology International*, 21(6), 923-935.
- De Antueno, R. J., Elliot, M., & Horrobin, D. F. (1994). Liver  $\Delta$ -5 and  $\Delta$ -6 desaturase differs among laboratory rat strains. *Lipids*, 29, 327-331.
- Dixon, P. (2008). Models of accuracy in repeated-measures designs. *Journal of Memory and Language*, 59(4), 447-456.
- Edwards, P., Clarke, M., DiGuseppi, C., Pratap, S., Roberts, I., & Wentz, R. (2002). Identification of reomized controlled trials in systematic reviews: Accuracy and reliability of screening records. *Statistics in Medicine*, 21, 1635-1640.
- Fidler, T. L., Bakner, L., & Cunningham, C. L. (2004). Conditioned place aversion induced by intragastric administration of ethanol in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(4), 731- 743.

- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science*, 4, 123-124.
- Garcia, Ervin & Koelling, (1966). Learning with long delay of reinforcement. *Psychonomic Science*, 5(3), 121-122.
- Garg, A. X., Hackam, D., & Tonelli, M. (2008). Systematic review and meta-analysis: When one study is just not enough. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, 253-260.
- Gauvin, D. V., Briscoe, R. J., Goulden, K. L., & Holloway, F. A. (1994). Aversive attributes of ethanol can be attenuated by dyadic social interaction in the rat. *Alcohol*, 11, 247-251.
- Gauvin, D. V., Briscoe, R. J., Baird, T. J., Vallett, M., & Holloway, F. A. (1997). The paradoxical hedonic valence of acute ethanol withdrawal (hangover) states in rats: Place and taste conditioning. *Alcohol*, 14, 261-268.
- Gawel, K., Labuz, K., Gibula-Bruzda, E., Jenda, M., Marszalek-Grabska, M., Silberring, J., & Kotlinska, J. (2016). Acquisition and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in rats: Effects of the cholinesterase inhibitor donepezil and rivastigmine. *Journal of Psychopharmacology*, 30(7), 676-687.
- Gibbon, J., Baldock, M. D., Locurto, C., Gold, L., & Terrace, H. S. (1977). Trial and intertrial durations in autoshaping. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 3(3), 264-284.
- Gibula-Bruzda, E., Marzalek-Grabska, M., Gawel, K., Witkowska, E., Izdebski, J., & Kotlinska, J. H. (2015). The influence of the new enkephalin derivative, cyclo[N<sup>ε</sup>,N<sup>β</sup>-carbonyl-D-Lys<sup>2</sup>,Dap<sup>5</sup>] enkephalinamide (cUENK6), on reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in rats. *Physiology & Behavior*, 145, 50-56.
- Glass, G. V., Peckham, P. D., & Sanders, J. R. (1972). Consequences of failure to meet assumptions underlying fixed effects analyses of variance and covariance. *Review of Educational Research*, 42(3), 237-288.
- Gormezano, I., & Kehoe, J. (1981). Classical conditioning and the law of contiguity. In P. Harzem, & M. D. Zeiler (eds.), *Advances in the analysis of behavior (vol. 2): Predictability, correlation, and contiguity* (pp. 1-45). Nova York, NY: Wiley.
- Haggbloom, S. J. (1978). Intertrial interval effects on internal stimulus control of behavior in brightness differential conditioning. *Learning & Motivation*, 9(3), 347-358.
- Haleem, D. J., Hasnat, A., Shireen, E., Khan, A., & Haleem, M. A. (2005). Dopamine and serotonin neurotransmission in the reinforcing effects of alcohol and apomorphine. *Journal of College of Physicians and Surgions Pakistan*, 15(8),458-462.

- Harwell, M. R., Rubinstein, E. N., Hayes, W. S., & Olds, C. C. (1992). Summarizing Monte Carlo results in methodological research: the one- and two-factor fixed effects ANOVA cases. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 17(1), 315-339.
- Hoffman, D. C. (1989). The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. *Brain Research Bulletin*, 23, 373-387.
- Holloway, F. A., King, D. A., Bedingfield, & Gauvin, D. V. (1992). Role of context in ethanol tolerance and subsequent hedonic effects. *Alcohol*, 9, 109-116.
- Hu, Y., Hakkola, J., Oscarson, M., & Ingelman-Sundberg, M. (1999). Estrutural and functional characterization of 5'-flanking region of the rat and human Cytochrome P450 2E1 genes: Identification of a polyphormic repeat in the human gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263, 286-293.
- Huges, P. C. R., & Tanner, J. M. (1970). A longitudinal study of the growth of the black-hooded rat: Methods of measurement and rates of growth for skull, limbs, pelvis, nose-rump and tail lengths. *Journal of Anatomy*, 106(2), 349-370.
- Ise, Y., Mori, T., Nagase, H., & Suzuki, T. (2013). Rewarding effects of etanol combined with low doses of morphine through dopamine D1 receptors. *Journal of Nippon Medical School*, 80(1), 34-40.
- Kacew, S., & Festing, M. F. W. (1999). Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 5(3), 201-231.
- Kishida, T., Muto, S.-I., Hayashi, M., Tsutsui, M., Tanaka, S., Murakami, M., & Kuroda, J. (2008). Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 33(4), 447-457.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2006). Alcohol. In G. F. Koob, & M. Le Moal (auth.), *Neurobiology of addiction* (pp. 173-241). Nova York, NY: Academic Press.
- Kotlinska, J., Biała, G., Rafalski, P., Bochenski, M., & Danysz, W. (2004). Effect of neramexane on ethanol dependence and reinforcement. *European Journal of Pharmacology*, 503, 95-98.
- Kotlinska, J. H., Bochenski, M., & Danysz, W. (2011). The role of group I mGlu receptors in the expression of ethanol-induced conditioned place preference and ethanol withdrawal seizures in rats. *European Journal of Pharmacology*, 670, 154-161.



- Kotliska, J., Pachuta, A., Dylag, T., & Silberring, J. (2007). Neuropeptide FF (NPFF) reduces the expression of morphine- but not of ethanol-induced conditioned place preference in rats. *Peptides*, 28, 2235-2242.
- Krauth, J. (1992). Parametric analysis of sojourn times in conditioned place preference experiments. *Journal of Neuroscience Methods*, 42, 219-227.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., & Morato, S. (2008). Thigmotatic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 135-140.
- Lieber, C. S. (2004a). The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Reviews*, 36(3-4), 511-529.
- Lieber, C. S. (2004b). CYP2E1: From ASH to NASH. *Hepatology Research*, 28, 1-11.
- Livy, D. J., Parnell, S. E., & West, J. R. (2003). Blood ethanol concentration profiles: A comparison between rats and mice. *Alcohol*, 29, 165-171.
- Lix, L. M., Keselman, J. C., & Keselman, H. J. (1996). Consequences of assumption violations revisited: A quantitative review of alternatives to the one-way analysis of variance F test. *Review of Educational Research*, 66(4), 579-619.
- López, M., & Cantora, R. (2010). Opposite effects of ethanol on taste and place conditioning in rats. *Revista Iberoamericana de Psicología y Salud*, 1(2), 207-221.
- Lu, Shepard, Hall, and Shaham (2003)
- Lubow, R. E. (1965). Latent inhibition: Effects of frequency of nonreinforced preexposure of the CS. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 60(3), 454-457.
- Lubow, R. E., & Moore, A. U. (1959). Latent inhibition: The effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(4), 415-419.
- Mackintosh, J. H., Chance, M. R. A., & Silverman, A. P. (1977). The contribution of ethological techniques to the study of drug effects. In L. L. Iversen, S. D. Iversen, & S. H. Snyder (Eds.), *Handbook of psychopharmacology (Vol. 7): Principles of behavioral pharmacology* (pp. 3-35). New York, NY: Plenum Press.
- Marglin, S. H., MacKechnie, D. K., Mattie, M. E., Hui, Y., & Reid, L. D. (1988). Ethanol with small doses of morphine establishes a conditioned place preference. *Alcohol*, 5, 309-313.
- Martijena, I. D., Lacerra, C., Bustus, S. G., & Molina, V. A. (2001). Chronic benzodiazepine administration facilitates the subsequent development of ethanol dependence. *Brain Research*, 891, 236-246.

- McAllister, W. R., McAllister, D. E., Weldin, G. H., & Cohen, J. M. (1974). Intertrial interval effects in classically conditioned fear to a discrete conditioned stimulus and to situational cues. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 87(3), 582-590.
- McCance, I. (1989). The number of animals. *Physiology*, 4(5), 172-176.
- Melchior, C. L., & Myers, R. D. (1976) Genetic differences in Ethanol drinking of the rat following injection of 6-OHDA, 5,6-DHT or 5,7-DHT into the cerebral ventriculum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 5, 63-72.
- Melis, M. Enrico, P., Peana, A. T., & Diana, M. (2007). Acetaldehyde mediates alcohol activation of the mesolimbic dopamine system. *European Journal of Neuroscience*, 26, 2824-2833.
- Morales, M., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2012). Evidence for conditioned place preference to a moderate dose of ethanol in adult male Sprague-Dawley rats. *Alcohol*, 46, 643-648.
- Morse, A. C., Schulties, G., Holloway, F. A., & Koob, G. F. (2000). Conditioned place aversion to the "hangover" phase of acute ethanol administration in the rat. *Alcohol*, 22, 19-24.
- NRC (2003). Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. Nova York, NY: National Academy Press.
- NRC (2010). Guide for the care and use of laboratory animals (8th ed.). Nova York, NY: National Academy Press.
- Nurmi, M., Kiianmaa, K., & Sinclair, J. D. (1994). Brain ethanol in AA, ANA, and Wistar rats monitored with one-minute microdialysis. *Alcohol*, 11(4), 315-32.
- Pahl, P. J. (1969). Growth curves for body weight of the laboratory rat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22, 1077-1080.
- Pascual, M., Do Couto, B. R., Alfonso-Loeches, S., Aguilar, M. A., Rodriguez-Arias, M., & Guerri, C. (2012). Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology*, 62, 2309-2319.
- Patkina, N. A., & Zvartau, E. E. (1998). Caffeine place conditioning in rats: Comparison with cocaine and ethanol. *European Neuropsychopharmacology*, 8, 287-291.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes*. London, RU: Oxford University Press.
- Peana, A. T., Enrico, P., Assaretti, A. R., Pulighe, E., Muggironi, G., Nieddu, M., Piga, A., Lintas, A., & Diana, M. (2008). Key role of ethanol-derived acetaldehyde in the motivational properties induced by intragastric ethanol: A conditioned place preference study in the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(2), 249-258.

- Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1987). Anatomical and neurochemical substrates of drug reward determined by the conditioning place preference technique. In M. A. Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 275-290). New York, NY: Springer-Verlag.
- Podsakoff, P. M., MacKenzie, S. B., Lee, J.-Y., & Podsakoff, N. P. (2003). Common method biases in behavioral research: A critical review of the literature and recommended remedies. *Journal of Applied Psychology*, 88(5), 879-903.
- Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2009) Conditioned place preference. In J. J. Buscufusco (Ed.), *Methods of behavior analysis in neuroscience* (2<sup>nd</sup> ed.) (pp. 59-76). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Quertemont, E., & De Witte, P. (2001). Conditioned stimulus preference after acetaldehyde but not ethanol injections. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 68, 449-454.
- Quertemont, E., Goffaux, V., Vlamincq, A.-M., Wolf, C., De Witte, P. (1998). Oraal taurine supplementation modulates ethanol-conditioned stimulus preference. *Alcohol*, 16(3), 201-206.
- Reich, D. A., Green, M. C., Brock, T. C., & Tetlock, P. E. (2007). Biases in research evaluation: Inflated assessment, oversight, or error-type weighting? *Journal of Experimental Social Psychology*, 43, 633-640.
- Reid, L. D., Hunter, G. A., Beaman, C. M., & Hubbell, C. L. (1985). Toward understanding ethanol's capacity to be reinforcing: A conditioned place preference following injections of ethanol. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 22, 483-487.
- Rezayof, A., Gheipour, M., & Nazari-Serenjeh, F. (2012). Effects of co-injection of arachidonilcyclopropylamide and ethanol on conditioned place preference in rats. *Physiology & Behavior*, 107, 301-308.
- Risinger, F. O., Cunningham, C. L., Bevins, R. A., & Holloway, F. A. (2002). Place conditioning: What does it add to our understanding of ethanol reward? *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(9), 1444-1452.
- Robbins, T. W. (1977). A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity. In L. L. Iversen, S. D. Iversen, & S. H. Snyder (Eds.), *Handbook of psychopharmacology (Vol. 7): Principles of behavioral pharmacology* (pp. 37-82). New York, NY: Plenum Press.
- Roberts, B. J., Shoaf, S. E., & Song, B. J. (1995). Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochemical Pharmacology*, 49(11), 1665-1673.

- Rossi, N. L., & Reid, L. D. (1976). Affective states associated with morphine injections. *Psychobiology*, 4(3), 269-274.
- Sable, H. J., White, S. L., & Steinpreis, R. E. (2004). Effects of chronic naltrexone treatment in rats on place preference and locomotor activation after acute administration of cocaethylene or ethanol plus cocaine. *Alcohol*, 33, 51-61.
- Schechter, M. D. & Calganetti, D. J. (1993). Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17, 21-41.
- Schechter, M. D. & Calganetti, D. J. (1998). Continued Trends in the Conditioned Place Preference Literature from 1992 to 1996, Inclusive, with a Cross-Indexed Bibliography. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(6), 827-846.
- Schenk, S., Britt, M. D., Atalay, J., & Charleson, S. (1982). Isolation rearing decreases opiate receptor binding in rat brain. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 16, 841-842.
- Schenk, S., Ellison, F., Hunt, T., & Amit, Z. (1985). An examination of heroin conditioning in preferred and nonpreferred environments and in differentially housed mature and immature rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 22, 215-222
- Schenk, S., Hunt, T., Colle, L., & Amit, Z. (1983). Isolation versus grouped housing in rats: Differential effects of low doses of heroin in the place preference paradigm. *Life Sciences*, 32, 1129-1134.
- Schenk, S., Hunt, T., Malovechko, R., Robertson, A., & Amit, Z. (1986). Differential effects of isolation housing on the conditioned place preference produced by cocaine and amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 24, 1793-179.
- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624-630.
- Stewart, J. (1992). Plenary adress: Neurobiology of conditioning to drugs of abuse (pp. 335-346). In P. W. Kalivas, & H. H. Samson (Eds.) *The Neurobiology of drug and alcohol addiction*. Nova York, NY: New York Academy Press.
- Stewart, J., & Eikelboom, R. (1987). Conditioned drug effects. In L. L. Iversen, S. D. Iversen, & S. H. Snyder (Eds.), *Hebook of psychopharmacology: New directions in behavioral pharmacology* (1-57). Nova York: Plenum Press.
- Stewart, R. B., & Grupp, L. A. (1981). An investigation of the interaction between the reinforcing properties of food and ethanol using the place preference paradigm. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*, 5, 609-613.

- Stewart, R. B., & Grupp, L. A. (1985). Some determinants of the motivational properties of ethanol in the rat: Concurrent administration of food or social stimuli. *Psychopharmacology*, 87, 43-50.
- Schoedel, K. A., Sellers, E. M., & Tyndale, R. F. (2001). Induction of CYP2B1/2 and nicotine metabolism by ethanol in rat liver but not rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 62, 1025-1036.
- Swerdlow, N. R., Gilbert, D., & Koob, G. F. (1989). Conditioned drug effects on spatial preference: Critical Evaluation. In A. A. Boulton, G. B. Backer, & A. J. Greenshaw (Eds.), *Neuromethods: Psychopharmacology* (pp. 399-446) Clifton, NJ: Humana Press.
- Tsutsumi, M., Lasker, J. M., Takahashi, T., & Lieber, C. S. (1993). In vivo induction of hepatic P4502E1 by ethanol: Role of increased enzyme synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304, 209-218.
- Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56, 613-672.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12, 227-462.
- Van der Kooy, D. (1987). Place conditioning: A simple and effective method of assessing the motivational properties of drugs. In M. A. Bozarth (Ed.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (pp. 229-239). New York, NY: Springer-Verlag.
- Van der Kooy, D., O'Shaughnessy, M., Mucha, R. F., & Kalant, H. (1983). Motivational properties of ethanol in naive rats as studied by place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 19, 441-445.
- Umeno, M., Song, B. J., Kozak, C., Gelboin, H. V., & Gonzalez, F. J. (1988). The rat p-450IIE1 gene: complete intron and exon sequence, chromosome mapping, and correlation of developmental expression with specific 5 cytosine demethylation. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 4956-4962.
- Walker, B. M., & Ehlers, C. L. (2009). Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 91, 560-565.
- Walsh, R. N., & Cummins, R. A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 83, 482-504.
- Yu, L., Wang, L., Zhao, X., Song, M., & Wang, X. (2016). Role of single prolonged stress in acquisition of alcohol conditioned place preference in rats. *Life Sciences*, 151, 259-263.

- Zarrindast, M. R., Meshkani, J., Rezayof, A., Beigzadeh, R., & Rostami, P. (2010). Nicotinic acetylcholine receptors of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala are involved in ethanol-induced conditioned place preference. *Neuroscience*, 168(2), 505-513.
- Zhu, W., Bie, B., & Pan, Z. Z. (2007). Involvement of non-NMDA glutamate receptors in central amygdala in synaptic actions of ethanol and ethanol-induced reward behavior. *Journal of Neuroscience*, 27, 289-298.
- Zuo, W., Fu, R., Hopf, F. W., Xie, G., Krnjević, K., Li, J., Ye, J. H. (2017). Ethanol drives aversive conditioning through dopamine 1 receptor and glutamate receptor-mediated activation of lateral habenula neurons. *Addiction Biology*, 22(1), 103-116.

**Anexo A**  
**Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRO-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 29672

**Título:** CONDICIONAMENTO AO LOCAL INDUZIDO POR ETANOL EM RATOS: INVESTIGACAO SISTEMATICA DE BASES METODOLOGICAS E NEUROFISIOLOGICAS

**Vigência:** 20/07/2015 à 20/07/2017

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MIRNA BAINY LEAL - coordenador desde 20/07/2015  
Douglas Marques da Silva - Aluno de Mestrado desde 20/07/2015

**Equipe Externa:**

Eliane Dallegrave - pesquisador desde 20/07/2015  
José Inácio Lemos Monteiro Carvalho - pesquisador desde 20/07/2015

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de utilizando 310 ratos machos Wistar, com 2 meses de idade, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.**

Porto Alegre, Quinta-Feira, 1 de Outubro de 2015

*Cristiane Matte*

CRISTIANE MATTE  
Coordenador da comissão de ética

**Figura A.1.** Carta de aprovação do projeto ao qual o estudo experimental é vinculado.

## Apêndice A

### Artigos experimentais identificados, não adquiridos ou excluídos

#### I- Identificados e não adquiridos:

1. Suzuki, T., Shiozaki, Y., Moriizumi, T., & Misawa, M. (1992b). [Establishment of the ethanol-induced place preference in rats]. *Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison*, 27, 111-123.

#### II- Identificados, adquiridos, analisados e excluídos:

##### a) Aplicação de outro modelo antes do MCL:

2. Blatt, S. L., & Takahashi, R. N. (1999). Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 457-461.
3. Davies, B. T., & Parker, L. A. (1990). Novel versus familiar ethanol: A comparison of aversive and rewarding properties. *Alcohol*, 7, 523- 529.
4. Der-Avakian, A., Ble, S. T., Rozeske, R. R., Tamblyn, J. P., Hutchinson, M. R., & Watkins, L. R. (2007). The effects of a single exposure to uncontrollable stress on the subsequent conditioned place preference responses to oxycodone, cocaine, and ethanol in rats. *Psychopharmacology*, 191, 909-917.
5. Funk, D., Vohra, S., & Lê, A. D. (2004). Influence of stressors on the rewarding effects of alcohol in Wistar rats: Studies with alcohol deprivation and place conditioning. *Psychopharmacology*, 176, 82-87.
6. Gauvin, D. V., Briscoe, R. J., Theodore, J. Vallett, M., Carl, K. L., & Holloway, F. A. (1997). Cross-generalization of an EtOH “hangover” cue to endogenously and exogenously induced stimuli. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57(1/2), 199-206.
7. Gauvin, D. V., & Holloway, F. A. (1992). Historical factors in the development of ETOH-conditioned place preference. *Alcohol*, 9, 1-7.
8. Holloway, F. A., King, D. A., Bedingfield, & Gauvin, D. V. (1992). Role of context in ethanol tolerance and subsequent hedonic effects. *Alcohol*, 9, 109-116.
9. Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M., & Nagase, H. (1998). Involvement of  $\mu$ - and  $\delta$ - opioid receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Brain Research*, 803, 169-177.
10. Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M., & Nagase, H. (1999a). Different roles of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *European Journal of Pharmacology*, 368, 9-16.



11. Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M., & Nagase, H. (1999b). Involvement of dopamine D and D receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Brain Research*, 835, 298-305.
12. Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M., & Nagase, H. (1999c). Roles of 5-HT<sup>3</sup> and opioid receptors in the ethanol-induced place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Life Sciences*, 64(21), PL 241-249.
13. Matsuzawa, S., Suzuki, T., & Misawa, M. (2000). Ethanol, but not the anxiolytic drugs buspirone and diazepam, produces a conditioned place preference in rats exposed to conditioned fear stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(2), 281-288.
14. Nadal, R., Pallares, M., & Ferre, N. (1992). Conditioned place preference for ethanol and individual differences in rats. *Personality and Individual Differences*, 13(3), 287-294.
15. Schechter, M. D., & Krimmer, E. C. (1992). Differences in response to the aversive properties and activity effects of low dose ethanol in LAS and HAS selectively bred rats. *Psychopharmacology*, 107, 564-568.
16. Nizhnikov, M. E., Pautassi, R. M., Truxell, E., & Spear, N. E. (2009). Opioid antagonists block the acquisition of ethanol-mediated conditioned tactile preference in infant rats. *Alcohol*, 43, 347-358.

**b) Uso de fêmeas ou sexo não especificado:**

1. Acevedo, M. B., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., Molina, J. C., & Pautassi, R. M. (2013). Ethanol-induced locomotor activity in adolescent rats and the relationship with ethanol-induced conditioned place preference and conditioned taste aversion. *Developmental Psychobiology*, 55(4), 429-442.
2. Lee, J. S., Crawford, J., & Spear, N. E. (1998). Characteristics and consequences of freefeeding ethanol ingestion during the first two postnatal weeks of the rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 1615-1622.
3. Molina, J. C., Chotro, M. G., & Spear, N. E. (1989). Early (preweanling) recognition of alcohol's orosensory cues resulting from acute ethanol intoxication. *Behavioral and Neural Biology*, 51, 307-325.
4. Molina, J. C., Bannoura, M. D., Chotro, M. G., McKinzie, D. L., Arnold, H. M., & Spear, N. E. (1996). Alcohol-mediated tactile conditioned aversions in infant rats: devaluation of conditioning through alcohol-sucrose associations. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66, 121-132.

5. Nizhnikov, M. E., Pautassi, R. M., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2009). Conditioned preferences and aversions in infant rats mediated through ethanol inhalation. *Alcohol*, 43, 1-12.
6. Pautassi, R. M., Godoy, J. C., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2002). Early responsiveness to stimuli paired with different stages within the state of alcohol intoxication. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26, 644-654.
7. Pautassi, R. M., Molina, J. C., & Spear, N., (2008). Infant rats exhibit aversive learning mediated by ethanol's orosensory effects but are positively reinforced by ethanol's post-ingestive effects. *Pharmacology, Biochemistry, Behavior*, 88, 393-402
8. Philpot, R. M., Badanick, K. A., & Kirstein, C. L. (2003). Place Conditioning: Age-Related Changes in the Rewarding and Aversive Effects of Alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 27(4), 593-599.
9. Philpot, R. M., Engberg, M. E., & Wecker, L. (2014). Ethanol conditioned place preference and alterations in  $\Delta$ FosB following adolescent nicotine administration differ in rats exhibiting high or low behavioral reactivity to a novel environment. *Behavioral Brain Research*, 262, 101-108.
10. Quintanilla, M. E., & Tampier, L. (2011). Place conditioning with ethanol in rats bred for high (UChB) and low (UChA) voluntary alcohol drinking. *Alcohol*, 45, 751-762.
11. Stewart, R. B., Murphy, J. M., McBride, W. J., Lumeng, L. & Li, T. K. (1996). Place conditioning with alcohol in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 53, 487- 491.

**c) Efeito disruptivo ou sinérgico do álcool sobre o condicionamento induzido por outras drogas ou substâncias:**

1. Pautassi, R. M., Melloni, C., Ponce, L. F., & Molina, J. C. (2005). Acute ethanol counteracts the acquisition of aversive olfactory learning in infant rats. *Alcohol*, 36, 99-105.
2. Pautassi, R. M., Seers, S., Miller, S., Spear, N., & Molina, J. C. (2006). Early ethanol's anxiolytic effects assessed through an unconditional stimulus revaluation procedure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30, 448-459.
3. Smith, B. R., Amit, Z., & Splawinsky, J. (1984). Conditioned place preference induced by intraventricular infusions of acetaldehyde. *Alcohol*, 1, 193-195.

**c) Sem dados metodológicos:**

1. Colombo, G., Kuzmin, A., Fadda, F., Pani, L., & Gessa, G. L. (1990). Conditioned place preference induced by ethanol in a rat line selected for ethanol preference. *Pharmacological Research*, 22(Suppl. 3), 48.
2. Fadda, F., Colombo, G., & Gessa, G. L. (1990). Ethanol-induced place preference in naive alcohol-preferring rats. *Pharmacological Research*, 22(Suppl. 2), 184.

**d) Excluído pela via de administração:**

1. Walker, B. M., & Ettenberg, A. (2007). Intracerebroventricular ethanol-induced conditioned place preferences are prevented by fluphenazine infusions into the nucleus accumbens of rats. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), 401-410.

**e) Modelos combinados:**

1. Cunningham, C. L. (1979). Flavor and Location aversions produced by Etanol. *Behavioral and Neural Biology*, 27, 362-367.
2. Roma, P. G., Flint, W. W., Higley, J. D., & Riley, A. L. (2006). Assessment of the aversive and rewarding effects of alcohol in Fischer and Lewis rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 189, 187-199.
3. Sherman, J. E., Hickis, C. F., Rice, A. G., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1983). Preferences and aversions for stimuli paired with EtOH in hungry rats. *Animal Learning & Behavior*, 11(1), 101-106.

**f) Condicionamento de segunda ordem:**

1. Molina, J. C., Ponce, L. F., Truxell, E., & Spear, N. E. (2006). Infantile sensitivity to ethanol's motivational effects: ethanol reinforcement during the third postnatal week. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30, 1506-1519.
2. Molina, J. C., Spear, N. E., Spear, L. P., Mennella, J. A., & Lewis, M. J. (2007). Alcohol and development: beyond fetal alcohol syndrome. *Developmental Psychobiology*, 49, 227-242.
3. Molina, J. C., Pautassi, R. M., Truxell, E., & Spear, N. E. (2007). Differential motivational properties of ethanol during early ontogeny as a function of dose and postadministration time. *Alcohol*, 41, 41-5.
4. Pautassi, R. M., Myers, M., Spear, L. P., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2008). Adolescent but not adult rats exhibit ethanol mediated appetitive second-order conditioning. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32, 2016-2027.

5. Pautassi, R. M., Myers, M., Spear, L. P., Molina, J. C., & Spear, N. E. (2011). Ethanol induces second-order aversive conditioning in adolescent and adult rats. *Alcohol*, 45(1), 45-55.
6. Pautassi, R., Nizhnikov, M. E., Acevedo, M. B., & Spear, N. E. (2011). Naloxone blocks ethanol-mediated appetitive conditioning and locomotor activation in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, 216, 262-269.

**g) Administração de etanol na sessão de teste:**

1. Black, R. W., Albinak, T., Davis, M., & Schumpert, J. (1973). A preference in rats for cues associated with intoxication. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 2, 423-424.

**g) Condicionamento por auto-administração:**

1. Stewart, R. B., & Grupp, L. A. (1986). Conditioned place aversion mediated by orally self-administered ethanol in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 1369-1375.
2. Stewart, R. B., & Grupp, L. A. (1989). Conditioned place aversion mediated by self-administered ethanol in the rat: A consideration of blood ethanol levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 32, 431-437.

**h) Falha na identificação de procedimentos utilizados:**

1. West, C. H. K., Boss-Williams, K. A., Ritchie, J. C., & Weiss, J. M. (2015). Locus coeruleus neuronal activity determines proclivity to consume alcohol in a selectively-bred line of rats that readily consumes alcohol. *Alcohol*, 49 (7), 691-705.

## Apêndice B

### Fases de pré-exposição

**Tabela B.1.**Dados da fase de pré-exposição a tratamentos *sham* e ao etanol

Citação	Protocolo de administração					Protocolo de pré-exposição						Resultados		
	VIA	Composto	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	NSPE	DSPE (min)	ISPE (h)	IIF PE-H (h)	IIF PE-LB (h)	IIF PE-C (h)	PCL	ACL	NS
<b>Fase de pré-exposição a tratamentos <i>sham</i></b>														
Bieńkowski <i>et al.</i> (1997)	icv	ascorbato	0,1	10µL	NA	1	20	NA	NA	288	NA	-	E1	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iiig	água	NA	18,75	NA	3	NA	24	24	NA	NA	-	E1-E2	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iiig	água	NA	18,75	NA	15	NA	24	96	NA	NA	-	E3-E4	-
Cole <i>et al.</i> (2003)	ip	salina	NA	1	NA	4	NA	2	336	NA	NA	E4	-	-
Busse <i>et al.</i> (2005)	ip	água	NA	12,7	NA	5	NA	96	NA	NA	72	-	E1	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	ip	salina	NA	19	NA	8	NA	24 e 72	NA	~528	NA	E1, E3	-	-
Pascual <i>et al.</i> (2012)	ip	salina	NA	15	NA	8	NA	24 e 72	360	NA	NA	-	E5, E7	E1, E3
Becker <i>et al.</i> (2006)	ip	salina	NA	10	NA	13	NA	48	360	NA	NA	-	E2	E1
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	ip	salina	NA	6,5 e 13	NA	20	NA	24	24	NA	NA	E8	-	E4-E5, E9
Martijena <i>et al.</i> (2001)	ip	Tween 80	1 go/2mL	1	NA	21	NA	24	NA	96	NA	-	-	E1
<b>Fase de pré-exposição ao etanol</b>														
Ciccocioppo, Panocka, Polidori <i>et al.</i> (1999)	ing	EtOH	10	76/24h	7 e 1,5	1	360	NA	NR	NA	NA	E1	-	-
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	ing	EtOH	10	76/24h	7 e 1,5	11	360 e 2	24	96	NA	NA	E2-E3, E6	-	E1, E4
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	ing	EtOH	10	76/24h	7 e 1,5	11	360 e 2	24	96	NA	NA	-	-	E8-E10
Ciccocioppo, Panocka, Frolidi <i>et al.</i> (1999)	ing	EtOH	10	76/24h	7 e 1,5	11	360 e 2	24	96	NA	NA	-	-	E11-E16
Sable <i>et al.</i> (2004)	ing	EtOH	6	26	1,267	14	1	24	NA	~216	NA	-	-	E1
Reid <i>et al.</i> (1985)	ing	EtOH	6	8-11	NR	26	1	24	[864]	NA	NA	-	E1	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iiig	EtOH	10	12,5	1	4	NA	24	NA	NA	48	-	E7	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iiig	EtOH	10	12,5	1	4	10	24	NA	NA	48	-	E8	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iiig	EtOH	10	18,75	1,5	15	NA	24	96	NA	NA	-	E5-E6	-
Busse <i>et al.</i> (2005)	ip	EtOH	15	12,7	1,5	5	NA	96	NA	NA	72	-	E2	-
Alaux-Cantin <i>et al.</i> (2013)	ip	EtOH	20	19	3	8	NA	24 e 72	NA	~528	NA	-	-	E2, E4
Pascual <i>et al.</i> (2012)	ip	EtOH	25	15	3	8	NA	24 e 72	360	NA	NA	-	E6, E8	E2, E4
Gawel <i>et al.</i> (2016)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	24	NA	NA	E2-E16	-	-
Kotlinska <i>et al.</i> (2004)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	NA	24	NA	E1-E2	-	-

Citação	VIA	Composto	Conc (%v/v)	Vol (mL/kg)	Dose (g/kg)	NSPE	DSPE (min)	ISPE (h)	IIF PE-H (h)	IIF PE-LB (h)	IIF PE-C (h)	PCL	ACL	NS
Kotłinska <i>et al.</i> (2011)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	24	NA	NA	E1-E3	-	-
Kotłinska <i>et al.</i> (2007)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	NA	24	NA	E1	-	-
Biała e Kotłinska (1999)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	24	NA	NA	E1-E2	-	-
Gibula-Bruzda <i>et al.</i> (2015)	ip	EtOH	12,75	5	0,5	15	NA	24	24	NA	NA	E1-E15	-	-
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	ip	EtOH	10	6,5	0,5	20	NA	24	24	NA	NA	E1	-	-
Bieńkowski <i>et al.</i> (1995)	ip	EtOH	10	13	1	20	NA	24	24	NA	NA	-	-	E2
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	ip	EtOH	10	6,5	0,5	20	NA	24	24	NA	NA	E6	-	-
Bieńkowski <i>et al.</i> (1996)	ip	EtOH	10	13	1	20	NA	24	24	NA	NA	-	-	E7
Barbier <i>et al.</i> (2008)	iu e ing	EtOH	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	~936	NA	E4	-	E2, E6

**Nota:** [], dado de identificação duvidosa; **VIA**, via de administração; **Conc**, concentração da solução administrada; **Vol**, volume da solução administrada; **NSPE**, número de sessões de pré-exposição; **DSPE**, duração das sessões de pré-exposição; **ISPE**, intervalo entre as sessões de pré-exposição; **IIF PE-H**, intervalo interfásico pré-exposição-habituação; **IIF PE-LB**, intervalo interfásico pré-exposição- linha de base; **IIF PE-C**, intervalo interfásico pré-exposição-condicionamento; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, falha de condicionamento/resultado não significativo; **icv**, administração intracerebroventricular; **iig**, administração intragástrica (intubação); **ip**, administração intraperitoneal (injeção); **ing**, ingestão; **iu**, administração intrauterina; **EtOH**, etanol; **NA**, não se aplica; **NR**, não reportado; **En**, experimento acerca do qual os dados e o resultado são referentes.

## Apêndice C

### Fases de exposição continuada

**Tabela C.1.**Dados da fase de exposição continuada a tratamentos *sham* e ao etanol

citação	Protocolo de administração				Fase de exposição continuada								Resultados		
	VIA	Conc	Vol	Dose	Composto	NSEC	DSEC (min)	ISEC (h)	IES EC- H (min)	IES EC- LB (min)	IES EC- C (min)	IES EC- T (min)	PCL	ACL	NS
<b>Exposição continuada a tratamentos <i>sham</i></b>															
Ciccocioppo, Panocka, Polidori <i>et al.</i> (1999)	icv	NA	1µL	1µL/rato	salina	10	NA	24	NA	NA	2	NA	E1	-	-
Kotlinska <i>et al.</i> (2007)	icv	NA	5µl	5µl/rato	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	5	E1	-	-
Gibula-Bruzda <i>et al.</i> (2015)	icv	NA	5µl	5µl/rato	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	[60]	E1	-	-
Zuo <i>et al.</i> (2017)	ic	NR	300nL	300nL/rato	aCSF	8	NA	6-8 e 24	NA	NA	10	NA	E4, E6	-	-
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	ic	NR	0,4µL	0,4µL/rato	tocrisolve	3	4	24	NA	NA	0	NA	-	-	E4-E5
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	ic	NR	0,4µL	0,4µL/rato	tocrisolve	1	4	NA	NA	NA	NA	5	-	-	E7-E8
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	ic	NR	1µL	1µL/rato	tocrisolve	3	4	24	NA	NA	0	NA	-	-	E6
Rezayof <i>et al.</i> (2012)	ic	NR	1µL	1µL/rato	tocrisolve	1	4	NA	NA	NA	NA	5	-	-	E9
Bahi (2013)	ic	NR	2µl	2µl/rato	LV-scrRNA	1	10	NA	NA	-(NR)	NA	NA	E2, E4	-	E1, E3
Bahi & Dreyer (2014)	ic	NR	2µl	2µl/rato	LV-Mock	1	10	NA	NA	-(NR)	NA	NA	E1	-	-
Bahi & Dreyer (2013)	ic	NR	4µL	4µL/rato	LV-Mock	1	NR	NA	NA	-(NR)	NA	NA	E1	-	-
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	ic	0,1N	1µL	1µL/rato	NaOH	3	4	24	NA	NA	5	NA	-	-	E5-E6
Zarrindast <i>et al.</i> (2010)	ic	0,1N	1µL	1µL/rato	NaOH	1	4	NA	NA	NA	NA	5	-	-	E7-E8
Kotlinska <i>et al.</i> (2004)	ip	NA	NR	NR	água	1	NA	NA	NA	NA	NA	30	E1	-	-
Asin <i>et al.</i> (1985)	ip	NA	NR	NA	água	3	NA	24	0	0	NA	NA	-	-	E1-E10
Busse <i>et al.</i> (2005)	ip	NA	NR	NA	água	4	NA	48	NA	NA	0	NA	-	E1-E2	-
Kotlinska <i>et al.</i> (2004)	ip	NA	NR	NR	água	4	NA	48	NA	NA	30	NA	E2	-	-
Sable <i>et al.</i> (2004)	ip	NA	NR	NR	salina	4	NA	24	NA	NA	5	NA	-	-	E1
Bagrov <i>et al.</i> (1999)	ip	NA	NR	NA	salina	4	NA	24	NA	NA	20	NA	E1	-	-
Bedingfield <i>et al.</i> (1999)	ip	NA	NR	NA	salina	4	NA	24 e 48	NA	NA	30	NA	-	-	E1-E2
Borman & Cunningham (1997)	ip	NA	1mL/kg	NA	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	15	-	E1	-
Bahi (2013)	ip	NA	1ml/kg	NA	salina	2	NA	360	NA	0	NA	0	E2, E4	-	E1, E3
Melis <i>et al.</i> (2007)	ip	NA	1mL/kg	NA	salina	7	NA	48	NA	NA	-1	NA	E1	-	-
Peana <i>et al.</i> (2008)	ip	NA	1mL/kg	NA	salina	7	NA	48	NA	NA	-1	NA	E4, E6	-	E5
Peana <i>et al.</i> (2008)	ip	NA	1mL/kg	NA	salina	7	NA	48	NA	NA	30	NA	E7	-	-

Borman & Cunningham (1997)	ip	NA	1mL/kg	NA	salina	8	NA	24	NA	NA	15	NA	-	-	E2-E3
Al Ameri <i>et al.</i> (2014)	ip	NA	1ml/kg	NA	salina	[11]	NA	Variável	NA	0	0	NA	E1	-	-
Kotlinska <i>et al.</i> (2011)	ip	NA	2mL/kg	NA	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	15	E2-E3	-	-
Biala e Kotlinska (1999)	ip	NA	2ml/kg	NA	água	4	NA	48	NA	NA	15	NA	E2	-	-
Gawel <i>et al.</i> (2016)	ip	NA	2mL/kg	NA	salina	8	NA	24	NA	NA	20	NA	E3-E4	-	-
Bahi & Dreyer (2013)	ip	NA	3,2mL/kg	NA	salina	2	NA	312	NA	0	NA	0	E1	-	-
Bie <i>et al.</i> (2009)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	0	-	-	E6
Zhu <i>et al.</i> (2007)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	0	-	-	E3
Bie <i>et al.</i> (2009)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	3	NA	24 e 360	0	0	NA	0	E1-E5	-	-
Zhu <i>et al.</i> (2007)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	3	NA	24 e 360	0	0	NA	0	E1-E2, E4-E6	-	-
Biala e Lagwinski (1996b)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	9	NA	NA	NA	NA	5	NA	E1	-	-
Biala e Lagwinski (1996b)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	9	NA	NA	NA	NA	15	NA	E2-E3	-	-
Biala e Lagwinski (1996a)	ip	NA	5mL/kg	NA	salina	10	NA	24	NA	NA	15	NA	E1	-	-
Bozarth (1990)	ip	NA	10mL/kg	NA	salina	1	NA	NA	NA	NA	NA	0	E2	-	E1
Cunningham <i>et al.</i> (1993)	ip	NA	10mL/kg	NA	salina	2	NA	264	0	NA	NA	0	-	E1-E2	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iig	NA	8,75mL/kg	NA	água	4	NA	24, [264 e 120]	0	NA	1440	0	-	E1, E3, E5	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iig	NA	12,5mL/kg	NA	água	2	NA	120	NA	NA	NA	0	-	E7	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iig	NA	12,5mL/kg	NA	água	2	10	120	NA	NA	NA	10	-	E8	-
Fidler <i>et al.</i> (2004)	iig	NA	18,75mL/kg	NA	água	4	NA	24, [264 e 120]	0	NA	1440	0	-	E2, E4, E6	-
Biala e Kotlinska (1999)	ig	0,50%	5ml/kg	NA	MC	4	NA	48	NA	NA	30	NA	E1	-	-
Ise <i>et al.</i> (2013)	sc	NA	1mL/kg	NA	salina	3	NA	48	NA	NA	30	NA	-	-	E1-E10
Bienkowski <i>et al.</i> (1997)	sc	NA	1mL/kg	NA	salina	4	NA	24	NA	NA	20	NA	-	E1	-
Marglin <i>et al.</i> (1988)	sc	NA	1mL/kg	NA	salina	12	NA	24	NA	NA	3	NA	-	-	E1
<b>Exposição continuada ao etanol</b>															
Bienkowski <i>et al.</i> (1995)	ip	NA	13mL/kg	NA	salina	4	NA	48	-90	-90	-90	NA	-	-	E2
Bienkowski <i>et al.</i> (1995)	ip	NA	6,5ml/kg	NA	salina	4	NA	48	-90	-90	-90	NA	E1	-	-
Bienkowski <i>et al.</i> (1995)	ip	10% (v/v)	6,5ml/kg	0,5g/kg	EtOH	4	NA	48	-90	-90	-90	NA	E1	-	-
Bienkowski <i>et al.</i> (1995)	ip	10% (v/v)	13mL/kg	1	EtOH	4	NA	48	-90	-90	-90	NA	-	-	E2

**Nota:** [], dado de identificação duvidosa; **VIA**, via de administração; **Conc**, concentração da solução administrada; **Vol**, volume da asolução administrada; **NSEC**, número de sessões de exposição continuada; **DSEC**, duração das sessões de exposição continuada; **ISEC**, intervalo entre as sessões de exposição continuada; **IES EC-H**, intervalo entre sessões exposição continuada-habituação; **IES EC-LB**, intervalo entre sessões exposição continuada-linha de base; **IES EC-C**, intervalo entre sessões exposição continuada-condicionamento; **IES EC-T**, intervalo entre sessões exposição continuada-teste; **PCL**, preferência condicionada ao local; **ACL**, aversão condicionada ao local; **NS**, falha de condicionamento/resultado não significativo; **icv**, administração intracerebroventricular; **ic**, administração intracraniana; **ip**, administração intraperitoneal (injeção); **iig**, administração intragástrica (intubação); **ig**, administração intragástrica (gavagem); **sc**, administração subcutânea (injeção); **MC**, metilcelulose; **EtOH**, etanol; **NA**, não se aplica; **NR**, não reportado; **En**, experimento acerca do qual os dados e o resultado são referentes.