

Preferência condicionada de lugar (PCL) induzida por Fencanfamina: extinção do condicionamento e concentrações plasmáticas da droga

**Cleopatra S. Planeta¹
Roberto DeLucia²
Moacyr Luiz Aizenstein²**

¹ Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.
(14801-902) Araquarara-SP

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências
Biomédicas. Universidade de São Paulo. (05508-900)
São Paulo-SP

Resumo

A fencanfamina (FCF) é um psicostimulante classificado como um agonista dopaminérgico de ação indireta, para o qual existem vários relatos de uso abusivo. O paradigma da preferência condicionada de lugar (PCL) foi usado para investigar as propriedades reforçadoras da FCF. Foram abordados aspectos metodológicos da PCL induzida por FCF como a extinção do condicionamento e a ausência de concentrações plasmáticas da droga durante as sessões-teste.

Unitermos: fencanfamina, preferência condicionada de lugar, extinção do condicionamento, concentração plasmática.

Auxílio parcial : CNPq

Summary

Fencamfamine (FCF) is a psychostimulant classified as an indirect dopamine agonist and abuse of this drug has been reported. The conditioning place preference (CPP) paradigm was used to investigate the reinforcing properties of FCF. Some metodological aspects of the CPP-induced by FCF such as extinction of conditioning and lack of plasma FCF concentration during test-sessions are presently commented.

Key words: fencamfamine, place conditioning, reinforcement, extinction of conditioning, plasma fencamfamine levels

Introdução

Fencanfamina (FCF) (2-etilamino-3-fenil-biciclo 2,2,1-heptano) é um derivado da cânfora, com ação estimulante no sistema nervoso central e poucos efeitos circulatórios (Gorenstein et al., 1988). A FCF é uma substância de caráter básico, altamente lipossolúvel, sendo rapidamente absorvida por via oral. A meia-vida biológica da FCF em humanos é de aproximadamente 12 horas (Vree e Van Rossun., 1969). A FCF foi comercializada como energizante, em associação com vitaminas e glicose no tratamento da fadiga e como outros psicostimulantes, a FCF pode ser utilizada no tratamento da narcolepsia (Shindler et al., 1985). Entretanto, existem relatos do uso abusivo da FCF, principalmente entre atletas e estudantes (Delbecke e Dekackere, 1981; Planeta et al., 1989) e de seu comércio no mercado ilícito de drogas do EUA como substituto da cocaína (Gorodetzky et al., 1984).

Em ratos, a administração aguda da FCF produz alterações comportamentais semelhantes àquelas observadas com anfetamina e cocaína. Na dose de 3.5 mg/kg de FCF, há aumento na atividade exploratória observada em campo aberto. Com aumento da dose, a atividade exploratória é gradativamente substituída por comportamento estereotipado (Aizenstein et al., 1983). A FCF (3,0 – 10,0 mg/kg) reduz a ingestão de ração, o que sugere a presença de efeito anorexígeno (DeLucia et al., 1987). Todos esses efeitos da FCF são bloqueados pelo pré-tratamento com antagonistas dopaminérgicos como haloperidol e metoclopramida, ou pela associação

de reserpina e α -metil-p-tirosina que depleta a dopamina de ambos os sítios de armazenamento (DeLucia et al., 1984). Estudos de "binding" em membranas de corpo estriado demonstraram que a FCF não possui afinidade pelos sítios de ligação do ^3H -haloperidol (DeLucia et al., 1984). Com base nesses estudos a FCF pode ser classificada como agonista indireto do sistema dopaminérgico.

Embora existam relatos do uso abusivo da FCF poucos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial reforçador desta droga. Contudo, demonstrou-se que a FCF substitui a cocaína em paradigmas de discriminação de drogas (Cone e Risner, 1983). Além disso, a FCF é capaz de induzir auto-administração em macacos e cães, sugerindo que a droga pode atuar como reforço positivo (Estrada-Robles, 1974). De fato, foi relatado mais recentemente que a FCF pode agir como um reforçador positivo, e que os receptores dopaminérgico D1 e μ opioidérgicos estão relacionados com os efeitos reforçadores da FCF (Planeta et al., 1995).

A preferência condicionada de lugar (PCL) é uma metodologia simples e bastante sensível; por exemplo pôde demonstrar-se PCL com morfina em dose de apenas 0,08 mg/kg ou somente um pareamento da injeção da droga (4,0 mg/kg) com ambiente (Mucha et al., 1982). A PCL oferece muitas vantagens em relação a outros procedimentos operantes tais como, a autoadministração intravenosa ou intra-cerebral de drogas (Castanho et al., 1992). A PCL tem sido utilizada para demonstrar as propriedades reforçadoras de várias drogas dentre elas os psicostimulantes, como a anfetamina, a cocaína e o metilfenidato (Hoffman, 1989; Nomikos e Spiraki, 1988; Spiraki et al., 1982). No presente trabalho será utilizada essa metodologia para demonstrar a propriedade reforçadora da FCF e a extinção do condicionamento como também serão determinadas as possíveis interferências de concentrações plasmáticas residuais de FCF no teste da PCL.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos, albinos da linhagem Wistar provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram transferidos para o biotério do setor de

Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia e mantidos a temperatura de 22 ± 2 °C e sob ciclo de iluminação controlado, claro-escuro (claro entre 7 h e 19h) por um período mínimo de 3 semanas de adaptação. Durante o período que os animais estiveram em nosso biotério, foi mantido o fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados durante o ciclo de luz.

Drogas

Fencanfamina (Merck) foi dissolvida em salina 0,9% e administrada intraperitonealmente em um volume de 1,0 ml/kg.

Procedimentos

a) Avaliação da preferência condicionada de lugar.

A caixa de condicionamento é composta por dois compartimentos de tamanhos iguais medindo 44 x 15 x 22 cm (comprimento x largura x altura), separados por divisória removível. Um dos compartimentos tem as paredes lisas e brancas com chão em grades (1cm entre as barras) na superfície de apoio; o outro tem paredes e assoalho pretos e lisos.

O método utilizado para avaliação da PCL constitui-se de três fases:

Fase 1: Pré-condicionamento

Nesta fase os ratos foram colocados, por três dias consecutivos, em um dos compartimentos (preto ou branco), o qual denominamos "compartimento inicial", sem a divisória, de tal forma que os animais tiveram livre acesso a ambos os compartimentos. No terceiro dia registrou-se durante 15 minutos, o tempo que o animal permanecia em cada compartimento. O registro do tempo em cada compartimento iniciou-se a partir do momento em que o animal cruzou a linha divisória com as patas dianteiras.

Fase 2: Condicionamento

O condicionamento foi realizado em sessões de 30 minutos por 6 dias consecutivos. O esquema de condicionamento consistiu de 3 injeções

de salina e da droga em estudo, em dias alternados. Após a administração da droga em estudo o animal foi imediatamente confinado em um dos compartimentos por 30 min. No dia seguinte, o mesmo animal recebeu salina e foi confinado por trinta minutos no outro compartimento. O grupo controle recebeu salina em ambos compartimentos.

Fase 3: Pós-condicionamento

Após 24 horas do término das sessões de condicionamento cada animal sem receber a droga ou salina foi colocado no “compartimento inicial” com livre acesso a ambos os compartimentos. Registrou-se durante 15 minutos, o tempo que o animal permanecia em cada compartimento.

b) Avaliação da extinção do condicionamento.

A avaliação da extinção do condicionamento foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item a.

Após o registro da distribuição do tempo nos compartimentos na fase de pré-condicionamento (Fase 1), os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: um experimental (N=7) e outro controle (N=7). Na fase de condicionamento, cada animal do grupo experimental recebeu injeção de FCF (3,5 mg/Kg, i.p.) e foi confinado, por 30 minutos, no compartimento de menor tempo na Fase 1; no dia seguinte o animal recebeu salina e foi confinado no compartimento de maior preferência. O grupo controle recebeu salina nos dois compartimentos, ficando confinado em cada um deles por 30 minutos.

A fase 3 foi realizada 24, 48 e 72 horas após a última sessão de condicionamento com a finalidade de caracterizar a extinção da resposta condicionada.

c) Determinação das concentrações plasmáticas de FCF por cromatografia gasosa.

Seis animais receberam injeção i.p de FCF (3,5 mg/kg) e, 30 minutos após a injeção, os animais foram anestesiados com éter etílico e o sangue coletado da artéria abdominal. Outro grupo de 6 ratos recebeu três injeções de FCF(3,5 mg/kg) em dias alternados (simulando a fase de condicionamento). Vinte quatro horas após a última injeção o sangue foi coletado como descrito acima.

As determinações quantitativas da FCF no plasma foram realizadas a partir da adaptação do método proposto por Delbecke e Dekackere (1981). Brevemente, 100 µl da solução padrão (20 µl/ml) de 2-benzilaminonorbonano (padrão interno) foi adicionado a 2,0 ml de plasma alcalinizado (pH 10-11). A FCF foi extraída duas vezes com 3,0 ml de hexano. A fase orgânica foi evaporada à secura (60°C, sob fluxo de nitrogênio) e o resíduo evaporado foi ressuspensão em 0,5 ml de hexano. Reação de derivação foi realizada pela adição de 50 µl de bezeno: piridina (100:5, v/v) e 20 µl de anidrido hepta fluorbutírico, deixando reagir por 30 min a temperatura ambiente. Subsequentemente, a fase orgânica foi lavada três vezes com 10 mN de NaOH e 2 µl de hexano foram injetados no cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons. Coluna (1,5% OV17/ 1,95% QF1), temperaturas do injetor e do detector foram 170°, 200° e 200°C, respectivamente, e os tempos de retenção foram de 5,7 e 7,3 min para o padrão interno e FCF, respectivamente. Aliquotas de plasma com FCF (0.25, 0.50, 1.00 e 2.00 µl/ml) e com 2.0 µg/ml do padrão interno foram submetidas ao mesmo procedimento descrito acima. As relações de áreas da FCF para o padrão interno foram calculadas para obtenção da curva de calibração. A equação da curva obtida por regressão linear foi $Y = 0,07 + 0,48 X$ ($r = 0,998$) e a recuperação relativa foi de 95%.

d) Análise estatística

Os dados comportamentais foram apresentados em médias \pm E.P.M. e analisados através de ANOVA bifatorial, seguida da comparação das médias pelo teste de Newman-Keuls.

Resultados

A figura 1 mostra os resultados da avaliação da PCL induzida por 3,5 mg/kg de FCF e a extinção do condicionamento parcando-se a injeção da droga com ambos compartimentos.

A ANOVA bifatorial (fator tratamento e fase) para dados pareados mostrou interação significativa entre os fatores tratamento/fase [$F(3,36) = 4,30$; $p < 0,05$]. A partir desta observação o fator fase pode ser analisado independentemente do fator grupo.

No grupo tratado com FCF a análise de variância (fator fase) mostrou alterações significativas no tempo de permanência no lado pareado com a droga [$F(3,36) = 4,70$; $p < 0,05$]. A comparação múltipla das médias pelo teste de Newman-Keuls mostrou que o tempo no lado pareado com a droga foi significativamente maior após a observação dos animais 24 horas depois da última sessão de condicionamento, quando comparado à fase de pré-condicionamento. Nenhuma alteração foi observada quando o teste foi realizado 48 ou 72 horas após o término das sessões de condicionamento.

No grupo controle a análise de variância (fator fase) também mostrou alterações significativas no tempo de permanência no compartimento menos preferido [$F(3,36) = 5,15$; $p < 0,01$]. A comparação das médias pelo teste de Newman-Keuls mostrou aumento significativo no tempo de permanência no lado menos preferido 72 horas após a última sessão de condicionamento quando comparado a fase de pré-condicionamento. Não se observaram diferenças significativas comparando-se as observações 24 e 48 horas após o término do condicionamento com a fase de pré-condicionamento.

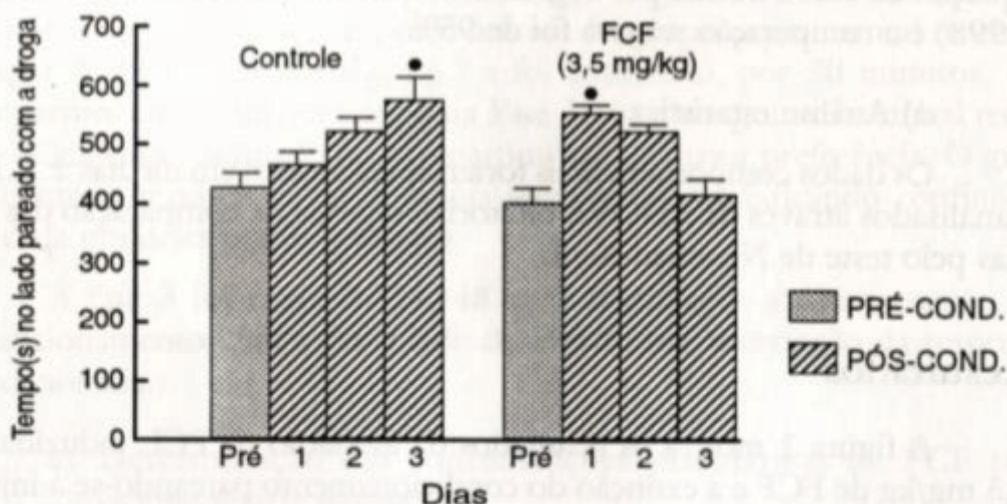


Figura 1: Tempo (s) de permanência (média \pm EPM) no lado pareado com FCF nas fases pré- ou 1, 2, 3 dias após a última sessão de condicionamento com FCF (3,5 mg/kg, i.p.). A injeção da droga foi pareada com o lado menos preferido na fase pré-. O grupo controle recebeu salina em ambos os lados ($n = 7$ /grupo).

- $p < 0,05$ (Newman-Keuls) grupo controle: dia 3 x pré-
grupo FCF : dia 1 x pré-

Efeito reforçador da fencanfamina em ratos

Na tabela 1 estão representados os resultados da determinação da concentração plasmática de FCF nas fases de condicionamento e pós-condicionamento. Trinta minutos após a injeção de FCF 3,5 mg/kg a concentração plasmática da droga foi de 109 ± 10 ng/ml. Nos animais que receberam três injeções de FCF em dias alternados não foi possível detectar a presença de FCF no plasma após a última injeção (limite de detecção do método 10 ng/ml).

Tabela 1: Concentrações plasmáticas de FCF nas fases de condicionamento (30 minutos após a injeção de 3,5 mg/kg, i.p.) e pós-condicionamento.

| FASE | FCF (ng/ml de plasma) |
|---------------------|-----------------------|
| condicionamento | 109 ± 10 |
| pós-condicionamento | não detectado* |

* Limite de detecção- 10 ng/ml

Discussão

No presente trabalho são abordados importantes aspectos metodológicos como a extinção do condicionamento e a ausência da droga na sessões-teste da avaliação da PCL induzida por FCF.

O experimento comportamental demonstra que a injeção de FCF (3,5 mg/kg) foi pareada com ambos os compartimentos da caixa de condicionamento. Foi adotado como critério confinar cada animal no lado de menor preferência na fase de pré-condicionamento, embora não houvessem diferenças significativas entre os tempos de permanência no compartimento branco ou preto. Utilizando este procedimento, observamos indução de PCL, confirmando resultados anteriores (Planeta et al., 1995).

Segundo os conceitos do condicionamento clássico, a magnitude da preferência condicionada deve diminuir ou extinguir-se com a exposição repetida ao ambiente na ausência do reforço (Hoffman, 1989; Wise e Bozarth, 1987). De fato, a partir do 2º dia de teste ocorreu diminuição do

tempo de permanência no lado pareado com a droga. Este parâmetro retornou aos valores obtidos na fase de pré-condicionamento no 3º dia da realização do teste, caracterizando, assim, a extinção da resposta condicionada.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Mithani et al. (1986), que demonstraram o mesmo padrão de extinção da PCL induzida por metilfenidato.

Ao contrário da extinção, no grupo controle ocorreu aumento progressivo no tempo de permanência no lado menos preferido inicialmente, sendo que este aumento atingiu significância estatística no 3º dia de teste. A análise de cada animal individualmente mostra aumento no tempo de permanência no lado preto da caixa de condicionamento, independente da preferência inicial (dados não apresentados). Como a maioria dos animais apresentaram o preto como lado menos preferido na fase de pré-condicionamento, os resultados, da maneira que foram expressos, refletem o aumento do tempo neste de compartimento da caixa de condicionamento após a realização de testes sucessivos. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por Houdi et al. (1989), que demonstraram diminuição significativa do tempo de permanência no compartimento branco em animais controle, sendo que esta diminuição acentua-se ao longo de três sessões-teste (1, 2, e 3 dias após o término do condicionamento).

O aumento do tempo de permanência no compartimento preto no grupo controle foi observado também em trabalho anterior (Planeta et al., 1995). Portanto, o compartimento branco parece tornar-se aversivo aos animais após a sessões de condicionamento. A partir dessas observações os procedimentos experimentais foram realizados, pareando a droga com o compartimento branco.

Outro ponto importante é que, na PCL, o teste é realizado na ausência da droga, o que evita que efeitos motores ou sensoriais decorrentes de que sua ação interfiram na avaliação do potencial reforçador (Hoffman, 1989; Mucha et al., 1982).

A administração repetida de FCF poderia provocar acúmulo e, conseqüentemente, as concentrações residuais da droga poderiam interferir na avaliação da PCL. Para eliminar esta possibilidade foi determinado a concentração plasmática de FCF após a injeção i.p. única de 3,5 mg/kg ou 24 horas após a última injeção da mesma dose, em animais submetidos ao

ou seja, a coleta de sangue foi realizado no tempo correspondente a sessão de teste.

A concentração plasmática de FCF associada ao efeito reforçador foi de 109 ± 10 , enquanto que a concentração de FCF 24 horas após a injeção ficou abaixo do limite de detecção do método que é de 10 ng/ml. Por outro lado, mesmo admitindo a presença de algum resíduo da droga, este se encontra em concentrações dez vezes menores do que aquelas relacionadas à dose de 3,5 mg/kg. Dificilmente esta concentração produziria alterações comportamentais capazes de interferir na avaliação da PCL, já que não se observam mudanças no comportamento com doses de FCF iguais ou inferiores a 1,0 mg/kg ou seja três vezes menores que a dose reforçadora (De Lucia et al., 1987).

Em conclusão, o uso deste esquema de condicionamento evidencia claramente o potencial reforçador da FCF e a extinção do condicionamento e demonstra que as concentrações plasmáticas residuais de FCF não interferiram com o teste da PCL.

Referências Bibliográficas

- Aizenstein, M.L.; Scavone, C.; Bernardi, M.M.; DeLucia, R. 1983. Comparative biochemical and behavioral effects of fencanfamine and dl-amphetamine in rats. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol.Psychiatry**, 7: 187-194.
- Castanho, A.R.S.P.; Planeta, C.S.; DeLucia, R. 1992. Modelos experimentais que avaliam os mecanismos de recompensa e dependência de drogas. **Biotemas**, 5: 65-78.
- Cone, E.J.; Risner, M.E. 1983. The reinforcing properties of fencanfamine HCl (F, Fake cocaine) in the dog. **Pharmacologist**, 25: 199.
- Delbeke, F.T.; Dekackere, M. 1981. Detection and metabolism of fencanfamine and the influence of acetazolamide on its urinary excretion. **Biopharm. Drugs Disposition**, 2: 17-30.
- DeLucia, R.; Planeta, C.S. 1990. Padrões de uso de psicoestimulantes e energizantes por universitários: análise do período de 1983-1988. **Revista ABP-APAL**, 11:111-113.
- DeLucia, R.; Bernardi, M.M.; Scavone, C.; Aizenstein, M.L. 1984. On the

- DeLucia, R.; Bernardi, M.M.; Scavone, C.; Aizenstein, M.L. 1984. On the mechanism of central stimulation action of fencamfamine. **Gen. Pharmacol.**, **21**: 161-163.
- DeLucia, R.; Planeta, C.S.; Scavone, C.; Aizenstein, M.L. 1987. Reduction of food intake by fencamfamine in rats. **Gen. Pharmacol.**, **18**: 21-23.
- Estrada-Robles, U. 1974. Autoadministracion y dependencia a las drogas. **Arch. Invest. Med.**, **5**:215-222.
- Gorenstein, C.; DeLucia, R.; Gentil, V. 1988. Psychostimulant effects of fencamfamine in healthy volunteers. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **21**:475-477.
- Gorodetzky, C.; Cone, E.J.; Johson, R.E.; Risner, M.E.; Su.T.P.; Yeah, S.Y. 1984. **Progress report for the NIDA addiction research center (preclinical laboratory)**. National Institute of Drug Abuse Research Monogram series, Lexington, KY. p. 63-68.
- Hoffman, D.C. 1989. The use of place conditioning in studying the neuropharmacology of drug reinforcement. **Brain Res. Bull.**, **23**: 373-387.
- Houdi, A.A.; Bardo, M.T.; Van Loon, G.R. 1989. Opioid mediation of cocaine-induced hiperactivity and reinforcement. **Brain Res.**, **497**: 195-198.
- Mithani, S.; Martin-Iverson, M.T.; Phillips, A.G.; Fibger, H.C. 1986. The effects of haloperidol on amphetamine and methylphenidate-induced conditioned place preference and locomotor activity. **Psychopharmacology**, **90**: 247-252.
- Mucha, R.F.; Van Der Kooy, D.; O'Shaughnessy, M.; Bucenicks, P. 1982. Drug reinforcement studied by use of place conditioning in rat. **Brain Res.**, **243**, 95-105.
- Nomikos, G.G.; Spiraki, C. 1988. Cocaine-induced place conditioning: importance of route of administration and other procedural variables. **Psychopharmacology**, **94**:119-125.
- Planeta, C.S.; Aizenstein, M.L.; DeLucia, R. 1995. Reinforcing properties of fencamfamine: involvement of dopamine and opioid receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **50**: 35-40.
- Shindler, J.; Schachter, M.; Brincat, S.; Parkes, J.D. 1985. Amphetamine, mazindol, and fencamfamine in narcolepsy. **Br. Med.J.**, **290**: 1167-1170.

Efeito reforçador da fencanfamina em ratos

Spiraki, C.; Fibiger, H.C.; Phillips, A.G. 1982. Cocaine-induced place preference conditioning: lack of effects of neuroleptics and 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Res.**, 253: 195-203.

Vrec, T.B.; Van Rossum, J.M. 1969. Suppression of renal excretion of fencanfamine in man. **Eur. J. Pharmacol.**, 7: 227-230.

Wise, R.A.; Bozarth, M.A. 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.**, 74: 469-492.