

Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

PUC-SP

Paulo Eduardo da Silva

Efeitos do protocolo de estressores sobre a preferência de água adoçada e sobre o consumo de ração em ratos submetidos a diferentes regimes de privação e sobre a aquisição de uma discriminação simples.

Doutorado em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento

São Paulo

2020

Paulo Eduardo da Silva

Efeitos do protocolo de estressores sobre a preferência de água adoçada e sobre o consumo de ração em ratos submetidos a diferentes regimes de privação e sobre a aquisição de uma discriminação simples.

Doutorado em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento

Tese apresentada à Banca Examinadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento, sob a orientação da Prof^a. Dra. Fani Eta Korn Malerbi

São Paulo

2020

Banca Examinadora

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 88887.148168/2017-00)

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88887.148168/2017-00”

- Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra.

Ernest Hemingway

À Luciana e ao Pedro Henrique, a melhor e mais

importante parte da minha vida.

Agradecimentos

Aos **animais de laboratório** que ao longo dos anos contribuem para o avanço da ciência e o bem-estar da humanidade.

Aos meus pais, **Paulo e Isabel**, pelo cuidado, amor e carinho ao longo dos anos.

À **Daniele, Wagner e Guilherme** por estarem presentes nos principais momentos da minha vida. Eu tenho a sorte de tê-los na minha vida.

Aos meus sobrinhos, **Guilherme, Heloísa, Theo e Vitória**, pelos abraços apertados, sorrisos e brincadeiras. O tio ama vocês.

À **Luciana**, minha esposa, companheira, amiga e confidente. Obrigado pela paciência de saber suportar as ausências que a vida acadêmica exige, mas sobretudo, pelo cuidado, amor e zelo por nossa família. O Pedro é um menino de sorte.

Ao **Pedro Henrique**, meu filho, por dar um novo significado a minha vida, por completar meus dias e pelo "sorriso banguelo" que alegra todos nós.

À **Fani, Maria Eliza, Mônica, Nilza e Paula** por contribuírem com a minha formação de docente e pesquisador. Eu sou grato pelo aprendizado e pela amizade.

À **Fani** pelo exemplo de disciplina, comprometimento e dedicação com seus orientandos. Obrigado pela parceria ao longo do mestrado e do doutorado (2013 a 2019), por ter aceito discutir dados do CMS durante esse período e por fazer de mim um pesquisador mais criterioso.

Ao **Maurício** por todo suporte e dicas de manejo com os animais.

À **Neusa** (Neusinha) por cuidar de todos no laboratório, pelas conversas e o café sempre (ou quase sempre) "fresquinho".

Ao **André** e ao **Fábio** pela amizade e as conversas nos intervalos entre coleta e escrita.

Ao **Carlos** (Carlão) pela ajuda com a parte burocrática, mas sobretudo pela amizade.

Aos membros da banca, **Denigés, Nilza, Maria e Roberto**, obrigado pela leitura cuidadosa, pelos apontamentos e trocas durante o exame de qualificação. É uma honra poder discutir este trabalho com vocês.

À **Letícia Tiemi** pela ajuda nos testes da coleta de 2016, pela amizade e parceria desde o tempo de iniciação científica.

À **Maria** (representando o pessoal da limpeza) pelo cuidado em manter o laboratório sempre limpo para os alunos, professores e funcionários. Muito obrigado.

Aos colegas e amigos do PEXP, em especial, **André Saconato, Arthur, Alberto, Ana Alice, Bruno Costa, Carlos Henrique, Felipe Souza, Henrique Angelo, Nathália Mieko, Luis Felipe, Luisa Schiveck, Mariana Amaral, Marcos Azoubel, Maria Vanesse, Rachel, Vitória, Vinicius Ferreira, Vinicius Sousa e Weslem**. Foi um prazer conviver com vocês.

À **Alexandra Asanovna Elbakyan**, fundadora do site Sci-Hub, por proporcionar acesso ilimitado a artigos e livros científicos a milhares de pesquisadores em todo mundo.

Por fim, à **CAPES** pelo financiamento da presente pesquisa.

Silva, P. E (2019). Efeitos do protocolo de estressores sobre a preferência de água adocicada e sobre o consumo de ração em ratos submetidos a diferentes regimes de privação e sobre a aquisição de uma discriminação simples. (Tese de Doutorado). Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fani Eta Korn Malerbi. **Linha de pesquisa:** Processos Básicos na Análise do Comportamento

Resumo

Anedonia é um sintoma central para o diagnóstico de depressão em humanos, descrita no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) como um déficit na capacidade de sentir prazer e interesse pelas coisas. O *Chronic Mild Stress* (CMS) foi proposto como um modelo animal de anedonia por Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987) ao verificarem que, após serem expostos a um conjunto de estímulos estressores moderados e incontroláveis, os indivíduos apresentavam um decréscimo no consumo de água adocicada. Entretanto, alguns estudos têm encontrado dificuldade em replicar os resultados relatados por Willner et al. (1987). Diferenças metodológicas referentes à privação, à linha de base e à sensibilidade de cada organismo a água com sacarose podem ser algumas das variáveis responsáveis pela discrepância nos resultados encontrados. O presente trabalho teve como objetivos: (1) avaliar os efeitos da submissão ao Protocolo de Estressores (PE) sobre o consumo de água e de água com sacarose sob diferentes regimes de privação e (2) avaliar os efeitos do PE sobre o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro. Foram utilizados 16 ratos machos da raça *Wistar*, experimentalmente ingênuos. Quando os sujeitos completarem 90 dias de vida, foi realizado o primeiro teste de consumo de água com sacarose colocando-se na gaiola viveiro uma garrafa contendo duas gramas de sacarose diluída em 98 ml de água (100 ml de solução água-sacarose) durante uma 1 hora. Sete dias após o primeiro teste, um segundo teste foi realizado seguindo a mesma rotina. Todos os testes foram realizados no mesmo horário e dia da semana. Sete dias após o segundo teste com uma garrafa, foi realizado o primeiro teste com duas garrafas, uma contendo 100 ml de água e a outra 100 ml de solução água-sacarose com o objetivo de avaliar a preferência dos animais. Os testes com duas garrafas foram realizados semanalmente até o final do experimento num total de 13 testes (4 antes, 6 durante o PE e 3 depois). O consumo dos líquidos foi calculado levando em consideração a

quantidade disponibilizada e a sobra após 1 hora. Os sujeitos foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos de igual tamanho. Os sujeitos do Grupo 1 foram os únicos que não foram submetidos ao PE e foram divididos em dois subgrupos: Grupo 1 23h - dois sujeitos foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes semanais de consumo e Grupo 1 85% - dois sujeitos foram submetidos à privação contínua de água para manter seus pesos a 85% ad lib. a partir de 90 dias de vida, permanecendo sob essa privação ao longo de todo o estudo. Os sujeitos do Grupo 2 foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação como componente do PE. Os sujeitos do Grupo 3 foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação como componente do PE + 85% ad lib. Os sujeitos do Grupo 4 foram submetidos à privação contínua de água a 85% ad lib. Os resultados mostraram que os pesos dos sujeitos variaram a depender do tipo de privação à qual foram submetidos. Independentemente do tipo de privação, o consumo de solução água-sacarose foi maior que o consumo de água nos testes realizados antes, durante e após o PE. Ao contrário do que prevê o Modelo do CMS proposto por Willner et al. (1987) a submissão ao PE foi acompanhada de um aumento no consumo de solução água-sacarose. Por outro lado, o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro antes, durante e depois do PE mostrou-se significativamente diferente para os sujeitos do Grupo G4 ($p=0,018$) com valores inferiores em vigência do PE, replicando os dados encontrados por Silva e Malerbi (2018) e fortalecendo a proposta de que essa medida seja uma alternativa à preferência de líquidos nos testes de consumo para avaliar os efeitos do PE, pelo menos em ratos privados de água num regime que os mantêm a 85% dos seus pesos ad lib. e que não são submetidos à privação de água e de ração como componentes do protocolo de estressores.

Palavras-chave: Análise do Comportamento, Privação, Sacarose, Protocolo de Estressores e Preferência

Silva, P. E (2019). Efeitos do protocolo de estressores sobre a preferência de água adoçada e sobre o consumo de ração em ratos submetidos a diferentes regimes de privação e sobre a aquisição de uma discriminação simples. (Tese de Doutorado). Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fani Eta Korn Malerbi. **Linha de pesquisa:** Processos Básicos na Análise do Comportamento

Abstract

Anhedonia is a main symptom for the diagnosis of depression in humans, described in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) as a deficit in the capacity of feeling pleasure and interest for things. The Chronic Mild Stress (CMS) was proposed as an animal model of anhedonia by Willner, Towell, Sampson, Sophokleous and Muscat (1987) when they verified that, after being exposed to a set of moderated stressful and uncontrollable stimuli, individuals presented a decrease on sweetened water consumption. However, some studies have found difficulties to replicate the results reported by Willner et al. (1987). Methodological differences related to deprivation, baseline and sensibility of each organism to water with sucrose can be some of the variables responsible for the discrepancy on the results. The present work aimed to: (1) evaluate the effects of the exposition to a Stressors Protocol (SP) on the consumption of water and water with sucrose under different deprivation schemes and (2) evaluate the effects of SP on the weekly consumption of ration in the cage. Sixteen experimentally naive male Wistar rats were used. When the subjects have reached 90 days old, the first water with sucrose consumption test was performed putting a bottle with two grams of sucrose diluted in 98 ml of water (100 ml of water-sucrose solution) for one hour in the cage. Seven days after the first test, a second test was accomplished following the same routine. All the tests were performed at the same time and day of the week. Seven days after the second test with one bottle, the first test with two bottles was performed, one of which containing 100 ml of water and the other 100 ml of water-sucrose solution aiming to assess the preference of the subjects. The two bottles tests were performed weekly until the end of the experiment totalizing 13 tests (4 before, 6 during SP exposition and 3 after). The consumption of liquids was calculated considering the amount available and the leftover after 1 hour. The subjects were distributed randomly among 4 groups with the same size. The subjects of Group 1 were not submitted to SP and were divided into two

subgroups: Group 1 23h – two subjects were submitted to a 23 hours water and food deprivation before the weekly consumption tests – and Group 1 85% – two subjects were submitted to continuous water deprivation to maintain their weights at 85% ad lib. (computed from the 90° day from birth), remaining under this deprivation for the whole study. The subjects of Group 2 were submitted to water and food deprivation before consumption tests + deprivation as a component of SP. The subjects of Group 3 were submitted to 23 hours deprivation of water and food before the consumption tests + deprivation as a component of SP + 85% ad lib. The subjects of Group 4 were submitted to continuous water deprivation at 85% ad lib. The results showed that the subjects weights varied depending on the kind of deprivation. Regardless of the sort of deprivation, the water-sucrose solution consumption was greater than the water consumption on the tests performed before, during and after the exposition to SP. Unlike what CMS model proposed by Willner et al. (1987) predicts the submission to SP was followed by an increase in water-sucrose solution consumption. On the other hand, the weekly food consumption in the cage before, during and after SP was significantly different for Group 4´ subjects ($p=0.018$) with lower values when the rats were submitted to SP, replicating data found by Silva and Malerbi (2018) and strengthening the proposal that this measure can be an alternative to the preference of liquids in the consumption tests to assess the effects of SP, at least in rats deprived of water in a scheme which keeps them at 85% of their weights ad lib. and not submitted to water and food deprivation as a component of stressors protocol.

Key-words: Behavior Analysis, Deprivation, Sucrose, Stressors Protocol and Preference

SUMÁRIO

Estudo I

Introdução.....	1
Método.....	13
Resultados.....	20
Discussão.....	27

Estudo II

Resumo.....	32
Abstract.....	34
Introdução.....	36
Método.....	39
Resultados.....	47
Discussão.....	57
Considerações finais.....	61
Referências.....	63
Apêndice A.....	69
Apêndice B	70

Lista de figuras

- Figura 1.* Pesos corporais de cada sujeito ao longo do estudo. A linha contínua na vertical indica o início da restrição hídrica. As linhas horizontais e verticais pontilhadas sinalizam a referência do peso ad lib. a 85% e o período de vigência do Protocolo de Estressores, respectivamente. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....21
- Figura 2.* Consumo de água e de água com sacarose de cada sujeito ao longo do estudo. Os espaços entre as linhas horizontais correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias de consumo de água com sacarose (MS) e água (MA) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....23
- Figura 3.* Média semanal de consumo de ração dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....24
- Figura 4.* Média semanal de consumo de água dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....26
- Figura 5.* Pesos corporais de cada sujeito ao longo do estudo. As linhas verticais pontilhadas sinalizam o período de vigência do Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....48
- Figura 6.* Consumo de água e de água com sacarose de cada sujeito ao longo do estudo. Os espaços entre as linhas horizontais correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias de consumo de água com sacarose (MS) e água (MA) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....49
- Figura 7.* Média semanal de consumo de ração dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).....51

Figura 8. Média semanal de consumo de água dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo). A seta indica a primeira semana em vigência da restrição hídrica por 23h30 diariamente para todos os sujeitos até o final do estudo.....53

Figura 9. Porcentagem de respostas dos sujeitos na condição luz, ao longo de oito sessões de discriminação. A linha horizontal indica o critério de aprendizagem (índice discriminativo) estabelecido no presente estudo. As médias (M) correspondem aos índices discriminativos em dois períodos avaliados (três sessões iniciais e três sessões finais).....54

Figura 10. Frequência de respostas dos sujeitos nas diferentes intensidades do estímulo ao longo de uma sessão de generalização em extinção.....56

Lista de tabelas

Tabela 1. <i>Diferentes Tipos de Privação Empregada e linha de base estabelecida nos Estudos Envolvendo o Chronic Mild Stress e o Modelo Operante.....</i>	<i>10</i>
Tabela 2. <i>Diferentes Condições Experimentais Empregadas Para Cada Sujeito e Grupos de Sujeitos.....</i>	<i>14</i>
Tabela 3. <i>Distribuição semanal dos estímulos estressores, conforme proposto por Willner et al. (1987).....</i>	<i>18</i>
Tabela 4. <i>Distribuição semanal dos estímulos estressores, conforme adaptado por Silva e Malerbi (2018).....</i>	<i>19</i>
Tabela 5. <i>Distribuição semanal dos estímulos estressores, conforme proposto por Willner et al. (1987).....</i>	<i>43</i>
Tabela 6. <i>Diferentes Condições Experimentais Empregadas em Cada Grupo.....</i>	<i>45</i>

Anedonia é um sintoma central para o diagnóstico de depressão em humanos, descrita no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) como um déficit na capacidade de sentir prazer e interesse pelas coisas. Modelos animais têm sido utilizados para reproduzir em laboratório condições análogas às observadas em doenças humanas (Antoniuk, Ponimaskin, & Wlodarczyk, 2018). Os termos em Inglês Chronic Mild Stress (CMS) referem-se a um modelo animal de anedonia desenvolvido por Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987) com base no estudo de Katz (1982) que verificou que ratos expostos a um conjunto de estímulos estressores moderados e incontroláveis, que compunham um Protocolo de Estressores (PE), apresentaram um decréscimo no consumo de água adocicada em relação ao consumo apresentado antes da submissão a esse protocolo.

O primeiro dos quatro experimentos de Willner et al. (1987) - todos realizados com ratos da linhagem Lister - teve como objetivo investigar os efeitos do PE na preferência por uma solução de água com 1% de sacarina em relação à água pura em 24 ratos. Além de trabalhar com uma solução adocicada com sacarina, o segundo experimento avaliou também a preferência de água adocicada com sacarose a 1% e acrescentou o objetivo de avaliar os efeitos do antidepressivo tricíclico denominado desmetilemipramina (DMI) em dois grupos de 10 ratos cada. O terceiro experimento, realizado com dois grupos de 11 ratos cada, teve os mesmos objetivos que o anterior além de verificar os níveis de corticosterona e de glicemia nos sujeitos. O quarto experimento - com dois grupos de seis ratos cada - também teve como objetivo verificar os efeitos do DMI sobre a preferência de água adocicada com sacarose, porém numa concentração menor (0,6%). O conjunto de estressores variou nos diversos experimentos realizados por esses autores. Nos experimentos 1 e 4, os estressores utilizados foram: (a) privação de

água e de ração; (b) iluminação contínua; (c) gaiola suja; (d) outro animal na gaiola; (e) inclinação da gaiola em 30°; (f) temperatura reduzida (10°C). Nos experimentos 2 e 3, os autores acrescentaram: (g) luz estroboscópica; (h) cheiro novo; (i) barulho intermitente; (j) exposição a uma garrafa vazia após um período de privação de água; (k) presença de um objeto estranho na caixa e (l) acesso restrito à ração na gaiola viveiro. No experimento 2, esses mesmos estressores foram utilizados, porém a intensidade destes foi aumentada gradualmente ao longo de seis semanas. O período de exposição ao PE foi de cinco, seis e nove semanas nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. O quarto experimento não teve sua duração especificada pelos autores.

Os resultados mostraram que todos os sujeitos de Willner et al. (1987) submetidos ao PE apresentaram uma redução na preferência por água adocicada (água com sacarose ou água com sacarina), enquanto o consumo de água pura manteve-se constante ao longo do estudo. No segundo e no terceiro experimentos, após duas semanas da administração do DMI, houve uma recuperação na preferência por água adocicada. Tanto os níveis de glicemia quanto os de corticosterona permaneceram inalterados ao longo do estudo. Nos testes de consumo, os sujeitos do quarto experimento apresentaram menor preferência pela solução com menor concentração de sacarose (0,6%) do que pela solução com maior concentração (1%). Willner et al. (1987) concluíram que a diminuição na preferência por água adocicada após a submissão ao PE não era produto de uma regulação calórica, pois essa redução ocorreu tanto com sacarose (substância calórica) quanto com sacarina (substância não calórica), nem decorrente da alteração dos níveis de corticosterona e de glicemia e hipotetizaram que o PE produziu uma insensibilidade à água adocicada o que poderia ser considerada um indicador de anedonia.

Dez anos após a publicação do primeiro trabalho envolvendo o *Chronic Mild Stress*, Willner (1997) realizou uma revisão dos estudos que utilizaram esse modelo a fim

de verificar o seu desenvolvimento bem como avaliar se este tem atendido aos critérios de *validade de construto*, *validade preditiva* e *validade aparente*.

Com relação à validade de construto, Willner (1997) ressaltou que o modelo do CMS se apoia no fato de o mesmo produzir anedonia - um sintoma característico da depressão em humanos. Segundo o autor, a validade preditiva do CMS baseia-se no fato de que diversos estudos que empregaram o uso de antidepressivos utilizados no contexto clínico mostraram que estes foram capazes de reverter a “anedonia” apresentada após o Protocolo de Estressores no CMS, enquanto o uso de outros fármacos sem ação antidepressiva (ansiolíticos, neurolépticos, psicoestimulantes e opióides) não tiveram o mesmo efeito. Para o autor, a validade aparente do CMS decorre do fato de que outras mudanças comportamentais observadas em ratos após a submissão ao PE, como o decréscimo nas atividades sexuais, a redução do comportamento agressivo, a redução nas atividades locomotoras, alterações no peso corpóreo, alterações no sono, entre outros, são também características da depressão em humanos.

Inicialmente estudado por meio da resposta consumatória de beber num teste de preferência, os efeitos do PE também foram avaliados por meio de outras respostas consumatórias, tais como o consumo de água e de ração na gaiola-viveiro, (Almeida, 2013; Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Lacerda, 2013; Oliveira, 2009; Pereira, 2009, 2015; Rodrigues, 2005; Silva & Malerbi, 2018; Thomaz, 2009) e de classes de respostas instrumentais, como a taxa de respostas em esquemas de razão progressiva (Barr & Phillips, 1998; Willner et al. 1998), em esquemas concorrentes de razão fixa (Dolabela, 2004; Pereira, 2009; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009), em esquemas concorrentes de intervalo variável (Cardoso, 2008; Silva & Malerbi, 2018), em esquemas concorrentes de tempo variável (Almeida, 2013) e em esquemas múltiplos que alternaram reforçamento e extinção envolvendo razão fixa (Rocha, 2013; Fonseca Júnior, Castelli &

Oliveira 2015) nos componentes de reforçamento. O estudo de respostas instrumentais como alternativa à medida de recompensa via resposta consumatória foi sugerida por Willner et al. (1998) que criticaram as medidas consumatórias como índice “confiável” de responsividade à recompensa e sugeriram que outras técnicas fossem utilizadas para abordar essa questão (p.273).

Já o consumo de água e de ração na gaiola-viveiro após a submissão ao PE variou nos diferentes estudos. Vale ressaltar que em alguns estudos (Almeida, 2013; Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Lacerda, 2013; Oliveira, 2009; Pereira, 2009, 2015; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009) a privação de água e de ração eram também componentes do PE, o que pode ter prejudicado a análise do efeito do Protocolo de Estressores sobre o consumo de água e de ração na gaiola-viveiro. A variabilidade no consumo de água e de ração na gaiola-viveiro parece ser uma consequência dos diferentes tipos de restrição hídrica e alimentar empregados à semelhança dos resultados de estudos que mostraram que diferentes padrões de consumo estão associados a diferentes procedimentos de privação (Fallon, 1965; Hagan & Moss, 1997; López-Espinoza & Martinez, 2001 e López-Espinoza, Ríos & Soto, 2004).

Um exame da literatura que avaliou o efeito do PE sobre a preferência por água adocicada revela que a concentração de sacarose variou nos diferentes estudos. Os resultados apresentados pela revisão realizada por Willner (1997) indicaram que a concentração de 2% de sacarose na água produziu um padrão estável de ingestão desse líquido na linha de base e permitiu a observação de uma diminuição na preferência por água com sacarose após a submissão dos sujeitos ao PE. No que diz respeito aos testes de consumo, alguns estudos (Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Oliveira, 2009; Thomaz, 2001, 2009) que adotaram a concentração de 2% de sacarose observaram um decréscimo no consumo de água com sacarose após a submissão ao PE. Entretanto, em outros estudos

que utilizaram essa mesma concentração (Almeida, 2013; Fonseca Júnior et al., 2015; Lacerda, 2013; Pereira, 2009; Rocha 2013; Silva & Malerbi 2018) não foi possível observar esse decréscimo nos testes de consumo. Com a mesma concentração de 8% de sacarose, alguns estudos (Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001) que avaliaram a taxa de respostas de pressão à barra sob um esquema concorrente FR-FR - uma barra associada com água pura e outra com água adoçada - observaram uma diminuição na taxa de respostas no componente associado com água adoçada após à submissão ao PE, mas empregando esquemas de reforçamento diferentes - concorrente VI-VI - Cardoso (2008) e Silva e Malerbi (2018) não obtiveram os mesmos resultados, tampouco Barr e Phillips (1998) e Willner et al. (1998) que utilizaram um esquema de razão progressiva, o que sugere que o esquema de reforçamento pode ter sido a variável responsável pela diferença de resultados.

Vários autores apresentaram a hipótese de que a quantidade de testes de consumo de água pura e de água com sacarose seria uma variável importante na determinação da diminuição da preferência por água com sacarose, sugerindo que a exposição prolongada à água adoçada poderia produzir uma analgesia nos animais, atenuando os efeitos dos estímulos aversivos presentes no Protocolo de Estressores (Bergmann, Cohen & Lieblich, 1984; Blass, Fitzgerald & Kehoe, 1987; Lieblich, Cohen, Ganchrow, Blass & Bergmann, 1983; Pereira, 2009; Segato, Castro-Souza, Segato, Morato & Coimbra, 1997).

Uma análise da literatura mostra que a quantidade de testes de consumo de água e de água com sacarose antes da submissão ao PE variou entre os estudos, mas a hipótese de analgesia não foi confirmada. A redução na preferência por água com sacarose após a submissão ao PE foi observada tanto em estudos que utilizaram poucos testes – três testes (Oliveira, 2009) e quatro testes (Cardoso, 2008; Thomaz, 2001, 2009) - quanto em estudos que empregaram uma quantidade maior de testes (12 e 16 nos estudos de Dolabela, 2004

e Rodrigues, 2005, respectivamente) antes do Protocolo de Estressores. No entanto, Almeida (2013), Fonseca Júnior et al. (2015), Lacerda (2013), Rocha (2013) e Silva e Malerbi (2018) que empregaram quatro testes antes do PE não observaram um decréscimo na preferência por água com sacarose nos testes de consumo, assim como Pereira (2009) que realizou 12 testes antes do PE.

Os autores que investigaram os efeitos do PE sobre a preferência de água com sacarose têm avaliado também outras variáveis como o peso dos animais ao longo dos estudos (Almeida, 2013; Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Fonseca Júnior et al., 2015;

Alguns estudos (Lacerda, 2013; Oliveira, 2009; Pereira, 2009; Rocha, 2013; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009; Silva & Malerbi 2018) observaram que os sujeitos diminuíram seus pesos após a submissão ao PE exceto um subgrupo do estudo de Pereira (2009) e para todos os animais do estudo de Silva & Malerbi (2018) quando retiraram o estímulo estressor “privação de ração” do Protocolo de Estressores. No estudo de Pereira (2015) tampouco houve redução no peso dos animais devido a uma privação mais branda de ração e de água (16h semanais) utilizada no protocolo adotado (D`Aquila et al., 1997) Vale ressaltar que a privação de água e/ou de ração tem, por si só, um efeito sobre o peso dos animais e sobre o consumo de água e de ração na gaiola-viveiro e isto pode ter mascarado o efeito do Protocolo de Estressores sobre essas medidas.

O tipo de privação adotado parece ser também uma variável relevante, quer seja parte integrante do protocolo (i.e. privação de água e/ou de ração como estímulos estressores) quer seja uma variável de controle do efeito reforçador da água ou da água com sacarose nas sessões operantes. De modo geral, nos estudos encontrados na literatura os animais foram submetidos a diferentes tipos de privação de água e de ração antes dos testes de consumo e das sessões operantes. Barr e Phillips (1998) adotaram uma privação de 20h de água e restringiram o acesso dos sujeitos à ração na gaiola- viveiro,

disponibilizando apenas 45 mg de ração diariamente ao longo de todo o estudo, com o objetivo de manter os animais a 90% dos seus pesos ad lib., e não observaram uma redução na preferência por água com sacarose após à submissão ao PE. Após privarem seus animais de alimento por 6 ou 23h antes das sessões operantes Willner et al. (1998) tampouco observaram um decréscimo na preferência pela barra associada à água com sacarose em vigência do Protocolo de Estressores.

Após adotarem um regime de privação de água no qual os animais eram mantidos a 85% dos seus pesos ad lib., além de privá-los de água e de ração por 23 horas antes dos testes de consumo Thomaz (2001), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005) observaram um decréscimo na preferência de água com sacarose nos testes de consumo. No entanto, com o mesmo esquema de privação, Almeida (2013), Lacerda (2013) e Rocha (2013) não obtiveram os mesmos resultados. O decréscimo na preferência da água adocicada tampouco foi observado por Cardoso (2008) que adotou 23,5 horas de privação de água diariamente mais privação de ração por 23h apenas antes dos testes de consumo, Pereira (2009) que adotou 23h de privação de água e de ração apenas antes dos testes de consumo, Fonseca Júnior et al. (2015) que submeteram seus sujeitos a 48h de privação de água e de ração antes dos testes de consumo e das sessões operantes e Silva e Malerbi (2018) que adotaram uma privação contínua de 85% ad lib..

Esses diferentes resultados têm gerado um questionamento na literatura sobre a o modelo de anedonia proposto por Willner et al. (1987).

Willner (1997; 2005; 2017) listou alguns estudos que têm encontrado dificuldades em replicar os “resultados esperados” (i.e., decréscimo no consumo de água adocicada após a exposição ao protocolo de estressores) sugerindo que a sensibilidade aos efeitos do CMS pode variar a depender: a) do tipo de linhagem de ratos (e.g., Wistar, Sprague-Dawley, Lister hooded, Long-Evans, etc.), (b) do fornecedor dos animais e das condições

de (pro)criação, (c) da hora de realização dos testes de preferência de líquidos, uma vez que para a linhagem Wistar deve-se levar em conta a hora em que os testes são realizados por causa do ciclo circadiano (D'Aquila, Newton, & Willner, 1997), (d) do momento do isolamento do animal na caixa viveiro antes do início do protocolo que pode afetar o estressor agrupamento presente no protocolo, (e) do conjunto de estressores contidos no protocolo empregado em laboratórios diferentes.

Willner (1999) reconheceu que o modelo apresenta duas limitações. A primeira diz respeito ao tempo de coleta, o que torna o procedimento extremamente demorado e laborioso. A segunda diz respeito à dificuldade relatada em alguns laboratórios em replicar os dados, por razões que permanecem “obscuras”, segundo o autor. Numa revisão realizada posteriormente, Willner (2005) sistematizou os dados apresentados por 60 grupos de pesquisas que submeteram ratos ao CMS e apresentaram mudanças comportamentais semelhantes às da depressão em humanos. Entretanto, o autor também identificou resultados contraditórios em estudos que empregaram o modelo do CMS.. Willner (2005) identificou quatro estudos que observaram aumento no consumo de água com sacarose ou sacarina (Bissette, Frederick & Halaris, 1999; Johnson, Soderpalm, Heilig & Engel, 1994; Murison & Hansen, 2001; Statham, 1997). Esses resultados foram considerados pelo autor “resultados anômalos” (Willner, 2005, p.99).

Alguns estudos envolvendo o modelo operante¹ e o CMS (Barr & Phillips, 1998; Cardoso, 2008; Dolabela 2004; Oliveira 2009; Rodrigues 2005; Thomaz 2001, 2009) replicaram os achados de Willner et al. (1987) nos testes semanais de consumo. Entretanto, estudos mais recentes (Almeida, 2013, Fonseca Júnior, Castelli & Oliveira, 2015; Lacerda, 2013, Pereira, 2009, 2015; Rocha, 2013 e Silva e Malerbi, 2018) não

¹ No presente trabalho “modelo operante” está relacionado ao emprego de esquemas de reforçamento e treino de discriminação simples, procedimentos empregados nos trabalhos citados.

replicaram os efeitos relatados por Willner et al. (1987). Tais estudos utilizaram diferentes tipos de privação e um número limitado de sujeitos submetidos à condição² semelhante à de Willner et al. (1987).

Nos estudos de Pereira (2009) e de Fonseca Júnior et al. (2015), três e seis sujeitos, respectivamente, foram submetidos à condição semelhante àquela do estudo de Willner et al (1987), a saber: 23 horas de privação de água e de ração antes dos testes semanais de consumo e privação de água e de ração como componente do protocolo. Nos estudos de Almeida (2013), Lacerda (2013) e Rocha (2013) quatro sujeitos foram utilizados em comum para os três estudos e foram submetidos à condição semelhante à de Willner et al. (1987), com três procedimentos de privação, ao longo do estudo, a saber: (1) privação de água até atingir e manter 85% do peso ad lib. após 90 dias de vida, (2) 23 horas de privação de água e de ração antes dos testes semanais de consumo e (3) privação de água e de ração como parte do Protocolo de Estressores.

No estudo de Silva e Malerbi (2018), o único sujeito que não passou por sessões operantes se assemelhando a uma condição do estudo de Willner et al. (1987) foi submetido apenas à privação de água até atingir e manter 85% do seu peso ad lib., ao longo de todo o estudo, ou seja, não foram empregados os procedimentos de privação de 23 horas de água e de ração antes dos testes semanais de consumo, nem privação de água e de ração como parte do Protocolo de Estressores

A Tabela 1 sintetiza as diferenças metodológicas referentes ao tipo de privação empregada e à quantidade de sujeitos utilizados em cada estudo, bem como os principais resultados referentes à linha de base e à produção de anedonia na medida de consumo

² Condição na qual os ratos são submetidos somente aos testes semanais de consumo e preferência de líquidos e ao Protocolo de Estressores.

(testes de preferência de líquidos) e mostra que dos 13 estudos analisados 6 não conseguiram replicar os dados de Willner et al (1987).

Tabela 1

Diferentes Tipos de Privação Empregada e linha de base estabelecida nos Estudos Envolvendo o Chronic Mild Stress e o Modelo Operante.

Estudo	Quantidade de sujeitos submetidos apenas aos testes de consumo e Protocolo de Estressores	Privação de 23 horas de água e de ração antes dos testes	Privação de água e de ração como parte do Protocolo de Estressores.	Privação de água a 85% do peso ad lib. a partir de 90 dias de vida.	Os dados encontrados por Willner et al. (1987) foram replicados
Barr & Phillips (1998)	11	20 horas	---	---	Sim
Cardoso ³ (2008)	1**	Sim	Sim	Não	Sim
Dolabela (2004)	2	Sim	Sim	Sim	Sim
Oliveira (2009)	1**	Sim	Sim	Sim	Sim
Rodrigues (2005)	2	Sim	Sim	Sim	Sim
Thomaz (2001)	2	Sim	Sim	Sim	Sim

³ **Nos estudos de Cardoso, 2008, Oliveira, 2009 e Thomaz, 2009; o sujeito utilizado foi o mesmo para os três estudos.

Thomaz (2009)	1**	Sim	Sim	Sim	Sim
Pereira (2009)	3	im	Sim	Sim	Não
Fonseca Júnior et al. (2015)	6	48h	Sim	Não	Não
Almeida (2013) ⁴	4*	Sim	Sim	Sim	Não
Lacerda (2013)	4*	Sim	Sim	Sim	Não
Rocha (2013)	4*	Sim	Sim	Sim	Não
Silva e Malerbi (2018)	1	Não	Não	Não	Não

Devido à dificuldade em replicar os achados de Willner et al. (1987), alguns autores (Lacerda; 2013; Pereira, 2015) têm sugerido que se desenvolvam medidas alternativas à medida de consumo e preferência de água com sacarose como indicadoras de anedonia.

Recentemente, Silva e Malerbi (2018) verificaram que quando os animais foram submetidos ao Protocolo de Estressores não ocorreu uma diminuição de preferência de água com sacarose, porém o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro diminuiu significativamente em vigência do protocolo. Nesse estudo o consumo de ração

⁴ * Nos estudos de Almeida, 2013; Lacerda,2013 e Rocha, 2013 os quatro sujeitos utilizados foram os mesmos para os três estudos.

permaneceu estável para o único sujeito não submetido ao protocolo. Com base nesses dados, esses autores sugeriram que o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro poderia ser uma alternativa para avaliar os efeitos do protocolo de estressores.

O presente trabalho teve como objetivos: (1) avaliar a influência de diferentes regimes de privação sobre o consumo de água e de solução água-sacarose após a submissão ao PE e (2) avaliar os efeitos do PE sobre o consumo diário de ração na gaiola-viveiro.

Método

O presente trabalho foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética e no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo). Número do processo: nº 0018/16. (Apêndice A)

Sujeitos

Dezesseis ratos machos da raça *Wistar*, experimentalmente ingênuos, provenientes do laboratório de Psicologia Experimental da PUC-SP foram nomeados S1 a S16 e distribuídos de forma aleatória por meio de um aplicativo para plataforma *Android* que sorteia números, em quatro grupos de igual tamanho.

Os sujeitos do Grupo 1 foram os únicos que não foram submetidos ao PE e foram divididos em dois subgrupos: Grupo 1 23h - dois sujeitos foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes semanais de consumo e Grupo 1 85% - dois sujeitos foram submetidos à privação contínua de água para manter seus pesos a 85% ad lib. a partir de 90 dias de vida, permanecendo sob essa privação ao longo de todo o estudo. Os sujeitos do Grupo 2 foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação como componente do PE. Os sujeitos do Grupo 3 foram submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação como componente do PE + 85% ad lib.. Os sujeitos do Grupo 4 foram submetidos à privação contínua de água a 85% ad lib.). A Tabela 2 sintetiza cada condição experimental empregada para cada um dos grupos.

Procedimento

Após completarem 30 dias de vida, os ratos foram alojados individualmente, e ao completarem 60 dias de vida, foram pesados diariamente e tiveram os consumos de água e de ração na gaiola-viveiro mensurados.

Tabela 2

Diferentes Condições Experimentais Empregadas Para Cada Sujeito e Grupos de Sujeitos.

Grupo	Quantidade de sujeitos por grupo	Privação de 23 horas de água e de ração antes dos testes	Privação de água e de ração como parte do Protocolo de Estressores.	Privação de água a 85% do peso ad lib. a partir de 90 dias de vida.	foi submetido ao Protocolo de Estressores?
Grupo 1 23h	2	Sim	Sim	Não	Não
Grupo 1 85%	2	Não	Não	Sim	Não
Grupo 2	4	Sim	Sim	Não	Sim
Grupo 3	4	Sim	Sim	Sim	Sim
Grupo 4	4	Não	Não	Sim	Sim

Ambiente, Materiais e Equipamentos

Foram utilizadas duas salas do biotério de Psicologia Experimental da PUC-SP. O ciclo luminoso foi de 12 horas claro e 12 horas de escuro, regulado por *timer* automático (exceto durante período de estressores no qual haverá um período de iluminação contínua). A temperatura e a umidade foram aferidas diariamente, por meio de um termo-higrômetro colocado nas salas.

Balança. Foi utilizada uma balança digital da marca Filizola, com precisão de 0,5g, utilizada para aferição do peso e do alimento dos sujeitos.

Garrafas. Foram utilizadas 48 garrafas de plástico com capacidade para 250 ml com bico regulador de saída de líquido para disponibilizar os líquidos para os animais. Dessas, 32 garrafas foram usadas apenas nos testes semanais de consumo (água ou água com sacarose) e 16 na disponibilização diária de água.

Seringas descartáveis. Foram usadas para medir as quantidades disponibilizadas e consumidas de água e de água com sacarose.

Luxímetro. Modelo MLM-1011-Minipa foi utilizado para garantir a mesma intensidade de luz nas duas salas utilizadas no presente experimento.

Decibelímetro. Modelo 407727-Extech foi utilizado a fim de garantir que o estressor barulho tivesse a intensidade de 85 decibéis.

Caixas viveiro. Feita de material plástico e dimensões 30 cm (Largura) x 45 cm (Profundidade) x 16 cm (Altura).

Gaiolas-viveiro. Dezesesseis gaiolas de aço inox com dimensões de 20 cm (Largura) x 30 cm (Profundidade) x 21 cm (Altura).

Solução água-sacarose. Foi utilizada a quantidade de 2 gramas de sacarose diluída em 98 ml de água para a composição de 100 ml de solução água-sacarose.

Sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores. Os animais permaneceram em uma sala isolada do Laboratório de Psicologia Experimental PUC-SP, medindo 0,90m de largura x 2,0m de profundidade x 2,80m de altura.

Testes de consumo e de preferência de líquidos

Testes com uma garrafa. Quando os sujeitos completaram 90 dias de vida foi realizado o primeiro teste de consumo com o objetivo de expor os animais à solução água-sacarose. Nesse teste colocou-se na gaiola-viveiro uma garrafa com 2 gramas de sacarose diluída em 98 ml de água para a composição de 100 ml de solução água-sacarose. Sete dias após o primeiro teste, um segundo teste foi realizado seguindo a mesma rotina. No primeiro teste a garrafa foi disponibilizada do lado esquerdo da parede frontal da gaiola viveiro, a 5cm da base da gaiola. No segundo teste a garrafa foi colocada no lado direito, também a 5cm da base da gaiola. O consumo do líquido foi calculado levando em consideração a quantidade disponibilizada e a sobra do líquido ao término do período de 1 hora. Todos os testes foram realizados no mesmo horário e dia da semana.

Testes com duas garrafas. Sete dias após o segundo teste de consumo, foi realizado o primeiro teste com duas garrafas, uma contendo 100 ml de água e a outra com 2 gramas de sacarose diluída em 98 ml de água para a composição de 100 ml de solução água-sacarose com o objetivo de avaliar a preferência dos animais. Os testes com duas garrafas foram realizados semanalmente até o final do estudo num total de 13 testes. Cada teste teve duração de 1 hora e as garrafas foram disponibilizadas na gaiola-viveiro de forma simultânea (duas garrafas acopladas ao mesmo tempo), equidistantes das laterais da caixa, a 5cm da base da gaiola, e os lados de apresentação das garrafas foram alternados semanalmente.

Consumo de ração

O consumo de ração na gaiola-viveiro foi mensurado levando em consideração a quantidade disponibilizada diariamente (60 gramas) e a quantidade de sobra na gaiola-viveiro após o período de 24h.

Protocolo de Estressores

O protocolo adotado no presente estudo compreendeu os seguintes estímulos estressores: a) luz estroboscópica: uma luz estroboscópica, localizada no chão da sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores; (b) inclinação da gaiola: a gaiola viveiro foi inclinada em 30° para trás; c) gaiola-viveiro suja: serragem molhada com 50ml de água foi colocada no chão da gaiola; d) barulho intermitente: um ruído branco intermitente de 85 decibéis foi ligado na sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores; e) cheiro: um desodorante purificador de ar; f) agrupamento: dois sujeitos foram colocados em uma mesma gaiola-viveiro, tanto na gaiola originalmente de um quanto na de outro; g) objeto estranho na gaiola: um objeto de metal redondo de 7 cm de diâmetro e 1,5cm de altura foi colocado na gaiola viveiro; h) iluminação contínua: a luz da sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores permaneceu acesa por 19 horas seguidas; (i) privação de água e de ração; (j) acesso restrito de ração (dois gramas) na gaiola-viveiro, disponibilizada após um período de privação de ração. As Tabelas 3 e 4 resumizam a distribuição semanal dos estímulos que compõem os dois Protocolo de Estressores, conforme proposto por Willner et al. (1987)⁵ e adaptado por Silva e Malerbi (2018)⁶, respectivamente.

Análise Estatística. Foram empregados os testes não paramétricos de Friedman para avaliar as medidas de peso, de consumo de água e de solução água-sacarose nos testes de consumo e de ração na gaiola-viveiro considerando como o nível de significância $p \leq 0,05$.

⁵ O estímulo estressor “redução da temperatura da sala a 10°C” não foi utilizado devido às especificidades do laboratório no qual foi realizada a pesquisa.

⁶ A adaptação é caracterizada pela retirada dos estressores “privação de ração”, “acesso restrito à comida” e “privação de água” do Protocolo de Estressores.

Tabela 4.

Distribuição semanal dos estímulos estressores, conforme adaptado por Silva e Malerbi (2018)

Horas	Domingo	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado
00:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
01:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
02:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
03:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
04:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
05:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
06:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
07:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
08:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
09:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
10:00	Agrupamento	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja
11:00			TESTE DE PREFERÊNCIA			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
12:00						Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
13:00	Barulho intermitente		Barulho intermitente			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
14:00	Barulho intermitente		Barulho intermitente			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
15:00	Barulho intermitente		Barulho intermitente			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
16:00	Luz estroboscópica		Barulho intermitente			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
17:00	Luz estroboscópica		Barulho intermitente			Inclinação da gaiola	Luz estroboscópica
18:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento
19:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento
20:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento
21:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento
22:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento
23:00	Inclinação da gaiola	Objeto estranho	Iluminação contínua	Odor de perfume	Iluminação contínua	Gaiola suja	Agrupamento

Resultados

A Figura 1 apresenta os pesos dos sujeitos ao longo do estudo e as médias referentes a um período de 53 dias⁷ antes da submissão ao PE, aos 42 seguintes (em vigência do PE aplicado a todos os grupos, exceto ao Grupo 1) e aos 20 dias subsequentes após o término do PE.

Como se pode ver, os sujeitos do G1 (tanto o G1 85% quanto o G1 23h) não variaram muito os seus pesos, exceto pela queda observada nos pesos dos sujeitos S13 e S15 no início da restrição hídrica. Comparando as médias dos pesos dos sujeitos desses grupos nos três períodos mencionados (que correspondem aos períodos antes, durante e depois do PE aplicado aos demais grupos) verificou-se por meio do teste de Friedman não ter ocorrido diferença significativa em ambos os grupos (G1 85% [p=0,223] e G1 23h [p=0,135]). Diferentemente a comparação das médias dos pesos dos demais sujeitos (G2, G3 e G4), nesses três momentos, mostrou ter ocorrido uma diferença significativa com os menores valores em vigência do protocolo (G2 e G3 [p=0,018] e G4 [p=0,039]).

⁷ Período entre o 90° e o 143° dia (dia que antecedeu o início do PE) de vida dos animais. O ganho de peso anterior a esse período não foi levado em consideração devido à maturação dos animais, uma vez que ao completarem 90 dias de vida os animais são considerados adultos jovens e o aumento do peso posterior passa a ser menos acentuado (Tomanari, Pine & Silva, 2003)

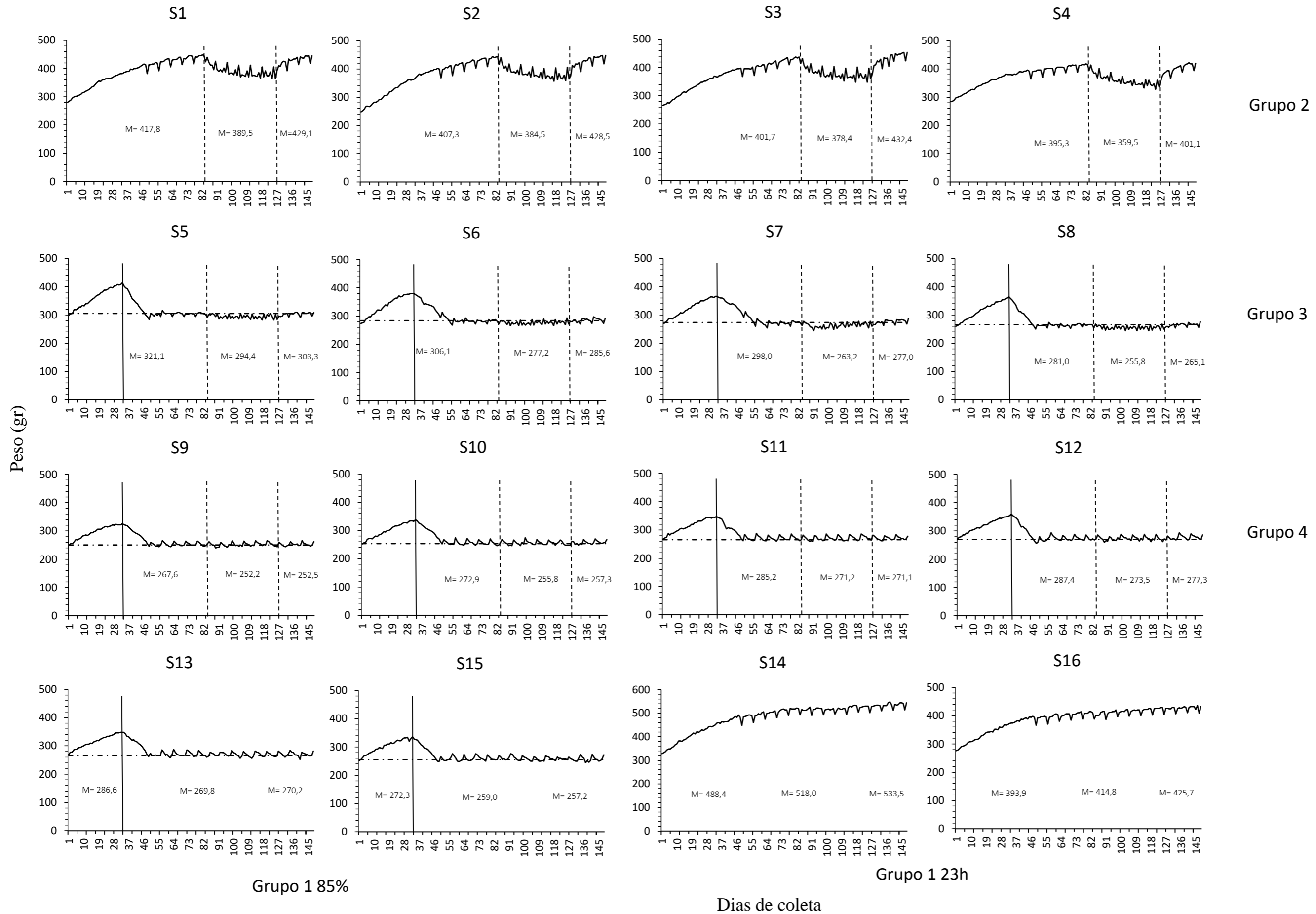


Figura 1. Pesos corporais de cada sujeito ao longo do estudo. A linha contínua na vertical indica o início da restrição hídrica. As linhas horizontais e verticais pontilhadas sinalizam a referência do peso ad lib. a 85% e o período de vigência do Protocolo de Estressores, respectivamente. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

Na Figura 2 são apresentados o consumo de água e de solução água-sacarose pelos animais ao longo do estudo nos testes de consumo.

Essa figura mostra que para os sujeitos do G1 85% e do G1 23h (que não foram submetido ao PE), o consumo de solução água-sacarose foi maior que o consumo de água nos 13 testes realizados, exceto nos testes 5°, 9° e 10° para o S15, no 6° para o S14 e no 3° para o S16 nos quais o consumo de água foi maior do que o consumo de solução água-sacarose. Também pode-se notar que no 6° teste do S15 o consumo foi igual para ambos os líquidos.

Para os sujeitos dos demais grupos (G2, G3 e G4) que foram submetidos ao PE e a diferentes tipos de privação ao longo do estudo, observou-se, em geral, uma preferência por solução água-sacarose, exceto em um teste (no 12°) para o sujeito S5 e em um teste (no 3°) para o sujeito S12 nos quais o consumo de água foi maior que o consumo de solução água-sacarose.

A comparação do consumo da solução água-sacarose antes, durante e depois do PE para os sujeitos do Grupo 2 mostrou ter ocorrido uma diferença significativa ($p=0,038$) com os maiores valores em vigência do PE. Diferentemente, essa mesma comparação realizada para os demais grupos (G1 85%, G1 23h, G3 e G4) não apontou uma diferença significativa no consumo de solução água-sacarose nesses três momentos (G1 85% [$p=0,223$], G1 23h [$p=0,135$], G3 [$p=0,368$] e G4 [$p=0,174$]).

A Figura 3 apresenta as médias semanais de consumo de ração na gaiola-viveiro pelos animais ao longo do estudo.

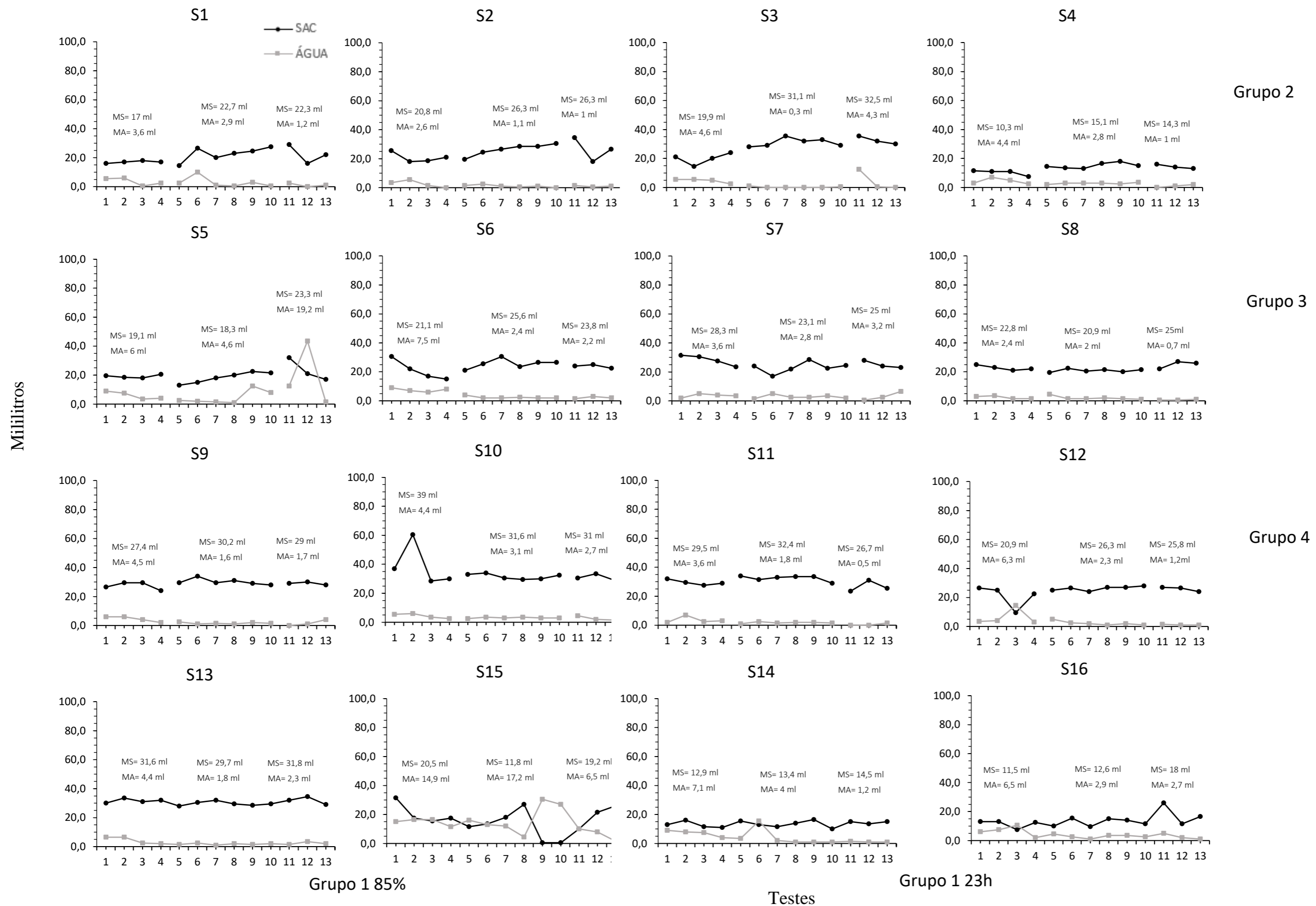


Figura 2. Consumo de água e de água com sacarose de cada sujeito ao longo do estudo. Os espaços entre as linhas horizontais correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias de consumo de água com sacarose (MS) e água (MA) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

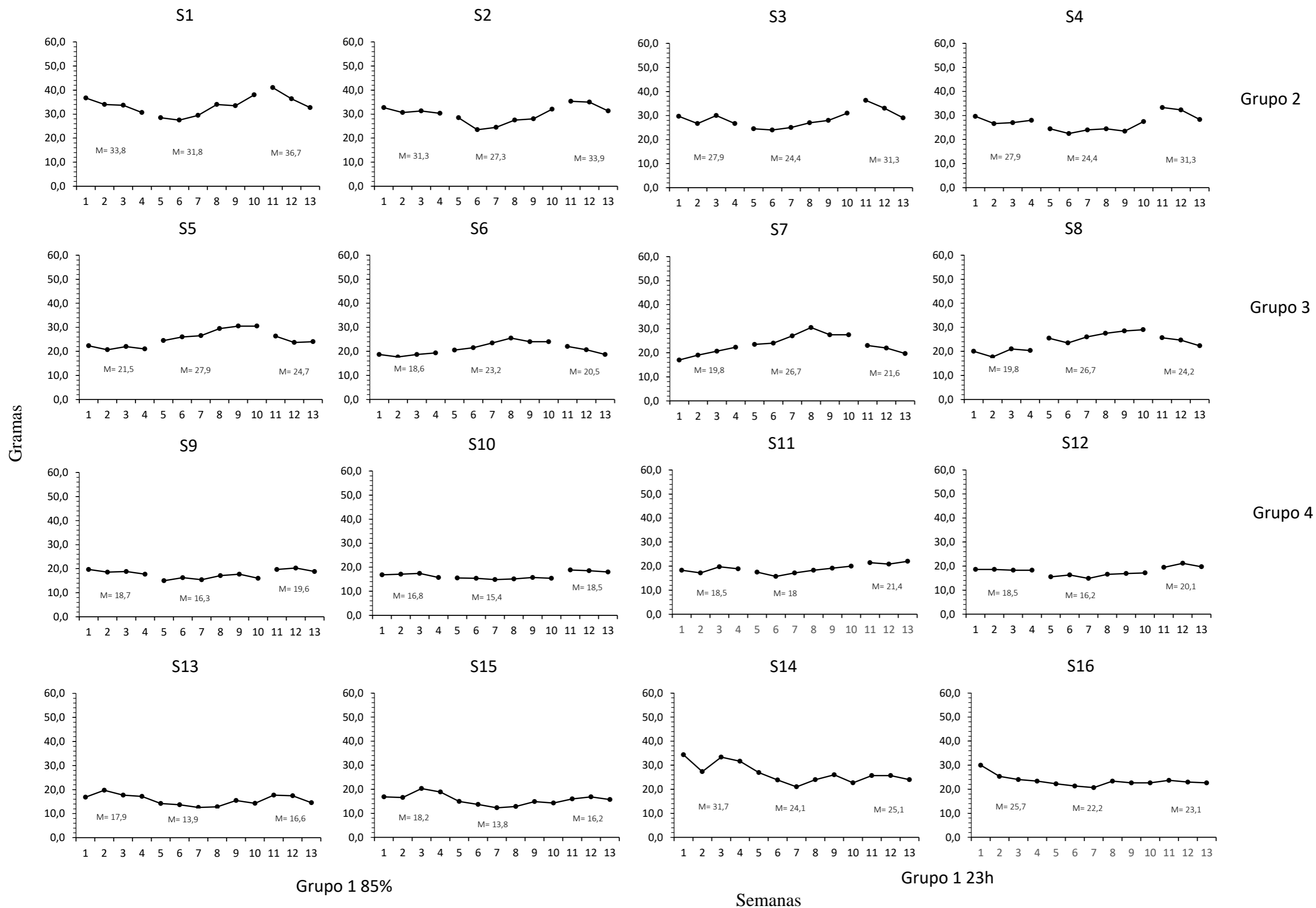


Figura 3. Média semanal de consumo de ração dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

É possível observar que a média de consumo de ração na gaiola-viveiro pouco oscilou ao longo das 13 semanas analisadas para os sujeitos que não foram submetidos ao PE (Grupos G1 85% e G1 23h). Entretanto, para os sujeitos dos demais grupos, que foram submetidos ao PE, nota-se que a média de consumo de ração variou a depender do regime de privação dos sujeitos. Para os sujeitos do grupo G2 (submetido à privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação contida no PE) e para os quatro sujeitos (S9, S10, S11 e S12) do grupo G4 que foram submetidos apenas à privação de água a 85% ocorreu uma redução na média de consumo de ração em vigência do PE. Para todos os sujeitos do grupo G3 (submetidos à privação de água a 85% ad lib. + privação de 23h de água e de ração antes dos testes de consumo + privação contida no PE) foi possível observar um aumento na média de consumo de ração durante o PE.

A comparação do consumo de ração antes, durante e depois do PE para os sujeitos dos Grupos G2 e G4 mostrou ter ocorrido uma diferença significativa para ambos ($p=0,018$) com os menores valores em vigência do protocolo e uma diferença significativa ($p=0,018$) para o Grupo G3 com maiores valores durante o PE. Diferentemente, essa mesma comparação realizada para os sujeitos dos grupos G1 85% e G1 23h não apontou uma diferença significativa no consumo de ração nesses três momentos ($p=0,135$).

Na Figura 4 são apresentadas as médias de consumo de água na gaiola-viveiro pelos animais dos Grupos G1 23h e G2 em cada semana ao longo do estudo, uma vez que foi disponibilizado o consumo *ad libitum* de água durante todo o estudo na gaiola-viveiro apenas para esses animais. Como se pode ver, para os dois sujeitos do G1 23h (que não foram submetidos ao PE), a média de consumo de água semanal diminuiu após as quatro primeiras semanas ocorrendo uma estabilidade entre a 5^o e a 13^o semanas.

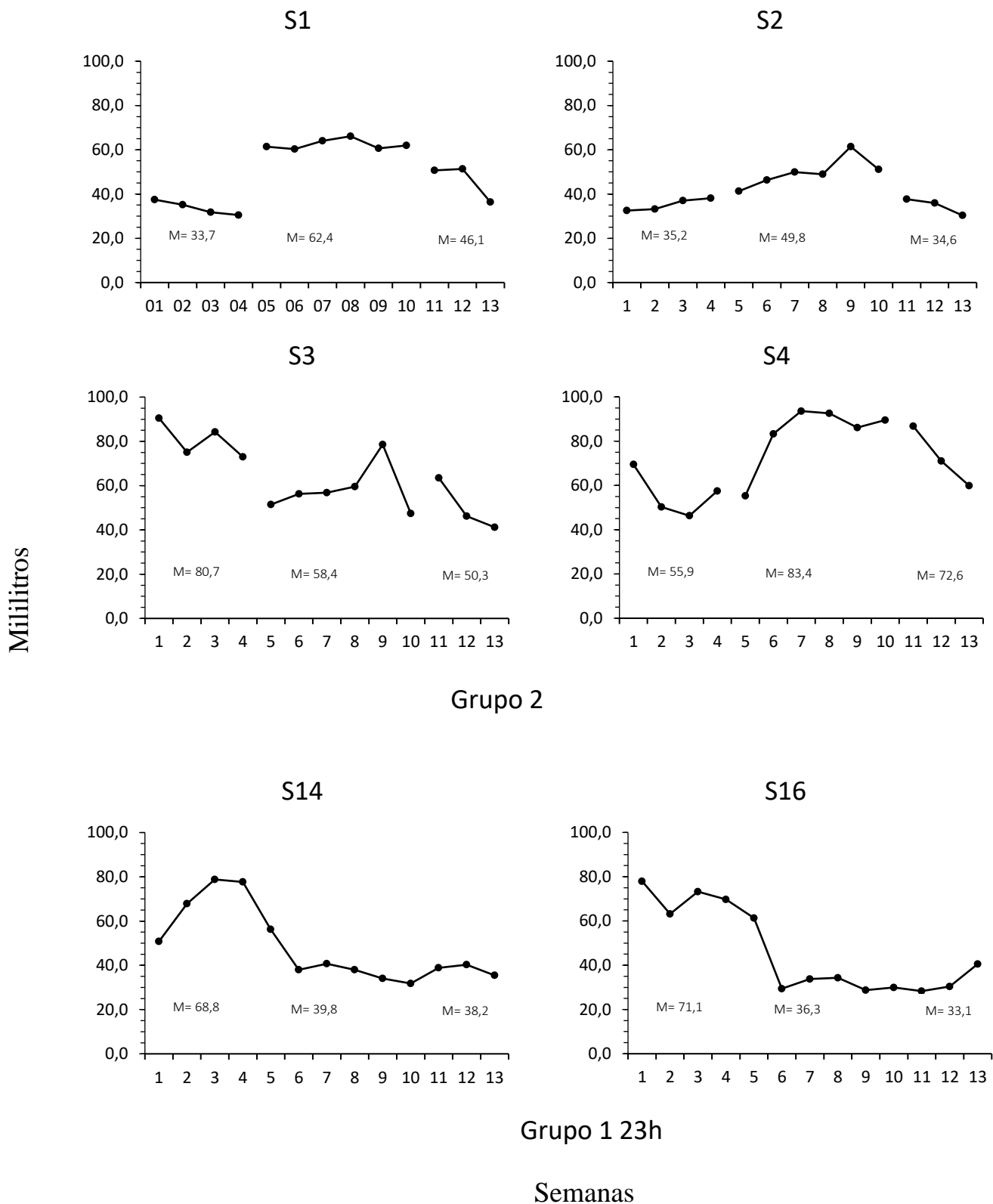


Figura 4. Média semanal de consumo de água dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

Para os todos os sujeitos do Grupo 2 (que foram submetidos ao PE), observou-se um aumento no consumo de água em vigência do PE, exceto para o S3 que diminuiu em média o consumo de água na gaiola-viveiro durante o PE.

A comparação do consumo de água antes, durante e depois do PE para os sujeitos experimentais do Grupo2 e do Grupo G1 23h mostrou não ter ocorrido diferença significativa ([$p=0,174$] e [$p=0,135$], respectivamente).

Discussão

Os dados do presente estudo mostraram que em vigência do PE os pesos corporais dos sujeitos variaram a depender da condição de privação. Para os sujeitos do G2 (submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes + privação contida no protocolo) ocorreu uma replicação da redução nos pesos em vigência do PE, observada nos estudos de Willner et al. (1987), Thomaz, (2001;2009), Dolabela (2004), Rodrigues (2005), Cardoso (2008), Oliveira (2009), Pereira (2009), Almeida (2013), Lacerda (2013), Rocha (2013) e Fonseca Júnior et al. (2015) nos quais, os animais foram submetidos pelo menos à privação de água e de ração como componentes do Protocolo de Estressores.

Os sujeitos do grupo G4 do presente estudo (submetidos durante todo o estudo apenas à privação de água a fim de manter seus pesos a 85% ad lib.) não apresentaram redução nos seus pesos em vigência do PE, replicando os dados encontrados em um subgrupo de Pereira (2009), por Pereira (2015) e por Silva e Malerbi (2018) em cujos estudos não houve privação de água e de ração como componentes do protocolo ou houve uma pequena redução (16 h semanais) na privação de ração contida no PE (Pereira, 2015).

É interessante notar que os sujeitos do presente estudo do grupo G3 que foram submetidos a uma privação mais intensa (privação de água para manter os pesos a 85% + privação de 23h de água e de ração antes dos testes + privação contida no protocolo)

não apresentaram uma redução nos seus pesos corporais em vigência do PE, diferentemente do que foi observado em outros estudos que adotaram esquemas de privação similares (Almeida, 2013, Dolabela, 2004, Lacerda, 2013, Rocha, 2013, Rodrigues, 2005 e Thomaz, 2001). Isto talvez tenha sido consequência dos ajustes realizados pelo experimentador do presente estudo que envolviam a liberação de água diariamente a fim de manter os animais a 85% dos seus pesos ad lib. Vale ressaltar que nos estudos que observaram uma redução dos pesos em vigência do PE sob o mesmo esquema de privação dos animais do grupo G2 do presente estudo também houve ajustes por parte dos experimentadores, porém utilizando-se um único sujeito como controle, diferentemente dos ajustes realizados no presente experimento que se basearam nos pesos individuais de cada animal. A estratégia de ajuste adotada no presente estudo deve-se ao fato de que nem todos os animais apresentam a mesma taxa de crescimento em situação ad libitum (Tomanari, Pine & Silva, 2003). Além disso, nos estudos de Almeida (2013), Lacerda (2013) e Rocha (2013) houve uma tolerância na oscilação dos pesos dos animais que poderiam variar entre 80% e 85% dos seus pesos ad lib. No presente estudo, com o objetivo de manter os animais sempre em 85% dos seus pesos ad lib o experimentador, provavelmente, liberava mais água que nos outros estudos citados. Esta pode ter sido a variável responsável pela diferença de resultados.

Apesar de alguns autores (Pereira, 2009; Thomaz, 2009) considerarem que a diminuição no peso dos sujeitos observada em alguns estudos que aplicaram o PE está relacionada ao conjunto de estressores, nem a aplicação do PE é acompanhada de uma redução nos pesos corporais dos animais. Por exemplo, no estudo de Pereira (2015) que empregou uma privação menos intensa de ração como componente do Protocolo de Estressores, submetendo seus sujeitos a apenas a 16h de privação de ração semanal durante o PE, e no estudo de Silva e Malerbi (2018) no qual os sujeitos não passaram por

privação de ração durante o PE não ocorreu redução no peso dos animais submetidos a esse protocolo, o que sugere que a redução no peso está sim diretamente relacionada às condições de privação.

Com relação aos 13 testes de consumo realizados no presente estudo (quatro antes, seis durante o protocolo e três depois) os resultados mostraram que independentemente da privação adotada, houve sempre preferência pela solução água-sacarose por todos os sujeitos, com poucas exceções. O aumento no consumo de solução água-sacarose em vigência do PE por alguns sujeitos foi considerado por Willner (2005) como um resultado “anômalo”, uma vez que se opõe ao que prevê seu modelo de anedonia (i.e. redução de preferência de solução água-sacarose durante o PE). Poderíamos questionar se de fato esses resultados são anômalos ou se indicam que o modelo não é capaz de prever resultados consistentes e replicáveis.

Durante as 13 semanas nas quais ocorreram os testes de consumo, foi realizada também a mensuração do consumo de ração na gaiola-viveiro pelos sujeitos e verificou-se uma variabilidade entre os diferentes grupos.

Os sujeitos do grupo G4 (submetidos durante todo o estudo apenas à privação de água a 85% ad lib.) e três dos quatro sujeitos do grupo G2 (submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes + privação contida no protocolo) reduziram o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro durante o PE (ainda que para o G4 a ração estivesse disponível o tempo todo no estudo) em comparação com o grupo controle, replicando os resultados de Silva e Malerbi (2018). Entretanto, os sujeitos do grupo G3 (submetidos à privação de água a 85% ad lib. + privação de 23h de água e de ração antes dos testes + privação contida no protocolo) apresentaram um aumento no consumo semanal de ração na gaiola-viveiro em vigência do PE.

Tendo observado uma redução no consumo de ração na gaiola-viveiro em vigência do PE, Silva e Malerbi (2018) sugeriram que este poderia ser uma alternativa para avaliar os efeitos do PE, uma vez que a ração estaria disponível o tempo todo na gaiola-viveiro em comparação com a medida consumatória de solução água-sacarose obtida nos testes realizados no período de uma hora, além do fato de que a depender do horário dos testes (período diurno ou noturno) os resultados têm se mostrado discrepantes (D'Aquila, Newton, & Willner 1997). No entanto, o desempenho dos animais do grupo G3 do presente estudo aponta para a importância de se considerar também o esquema de privação dos sujeitos.

Apenas para os sujeitos dos grupos G1 23h e G2 do presente estudo foram mensuradas as médias de consumo semanal de água na gaiola-viveiro durante todo o estudo, uma vez que para os demais sujeitos o acesso à água foi manipulado pelo experimentador, a fim de manter os seus pesos a 85% ad lib. Os resultados dessa medida foram variados. Para três dos quatro sujeitos do grupo G2 (submetidos à privação de 23h de água e de ração antes dos testes + privação contida no protocolo) houve um aumento no consumo semanal de água na gaiola-viveiro em vigência do PE, semelhantemente ao que foi encontrado por Almeida (2013), Cardoso (2008), Lacerda (2013), Pereira (2009) e Rocha (2013), ao passo que para os dois sujeitos do G1 23h houve uma redução no consumo a partir da quinta semana de mensuração, resultado este que talvez possa ser atribuído à mudança no tipo de garrafa de água devido ao alojamento (animais alocados em outra sala para a submissão ao PE) e espaço físico do laboratório no qual a pesquisa foi realizada.

Também deve-se considerar que nos estudos citados (Almeida, 2013, Dolabela, 2004, Fonseca júnior et al. 2015, Lacerda, 2013, Oliveira, 2009, Rocha, 2013, Rodrigues, 2005, Silva & Malerbi, 2018, Thomaz, 2001;2009), a temperatura e a umidade do

ambiente experimental podem ter contribuído para as diferenças de consumo de água na gaiola-viveiro, uma vez que, apesar de controladas, essas variáveis podiam oscilar em 3° graus e entre 30 a 80%, respectivamente.

Em síntese, os dados do presente estudo permitem concluir que a despeito do tipo de privação empregada e da quantidade de solução água-sacarose ingerida na linha de base houve uma preferência durante os testes de consumo de líquidos pela solução água-sacarose antes, durante e após o PE. Além disso, os dados do presente estudo indicam que dependendo do esquema de privação dos sujeitos, observa-se um efeito do PE sobre o consumo de ração na gaiola-viveiro.

Resumo

Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987) verificaram que ratos que inicialmente apresentavam uma preferência por água adocicada em relação à água pura ao serem expostos a um conjunto de estímulos estressores moderados e incontroláveis - chamado por eles de Chronic Mild Stress (CMS) – diminuíram essa preferência, o que foi considerado um indicador de anedonia por esses autores. Vários estudos não têm conseguido replicar esses dados nem quando avaliam a preferência de água adocicada usando os mesmos testes empregados por Willner et al. (1987), nem quando empregam outros procedimentos envolvendo respostas instrumentais. A análise das pesquisas da área aponta uma série de aspectos que variaram nos diferentes estudos como a quantidade de testes de preferência, os esquemas de reforçamento, as condições de privação dos animais, os componentes do Protocolo de Estressores (PE). Rocha (2013) apresentou dados sugerindo que o PE pode prejudicar a aquisição de uma discriminação operante, mas esses resultados não foram replicados por Fonseca Júnior, Castelli & Oliveira 2015. A comparação entre esses dois estudos mostra que o intervalo de tempo entre o término do PE e o início do treino discriminativo foi diferente, uma vez Rocha iniciou o treino discriminativo no dia seguinte ao término do PE e Fonseca Jr. et al. (2015) somente 35 dias após o término do PE. O presente trabalho teve por objetivo avaliar se a submissão ao PE afetaria diferencialmente a aquisição de um desempenho discriminativo dependendo do intervalo de tempo entre o término do PE e o início do treino discriminativo. Para isto comparou três intervalos 1, 15 e 35 dias. Os resultados mostraram que os pesos dos animais submetidos ao PE diminuíram significativamente ($p=0,000$) em vigência do PE em comparação aos sujeitos do grupo controle (não submetidos ao PE). O consumo de solução água-sacarose aumentou significativamente para os animais submetidos ao PE ($p=0,000$), contrariamente ao que prevê o modelo de anedonia proposto por Willner et al. (1987). O consumo semanal de ração e de água na gaiola-viveiro também aumentou em vigência do PE. A comparação das porcentagens de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões do treino discriminativo pelo teste Kruskal-Wallis indicou não ter ocorrido uma diferença significativa no desempenho dos quatro grupos no início do treino discriminativo ($p=0,860$). Uma

análise equivalente foi feita comparando-se os índices discriminativos nas três últimas sessões do treino discriminativo, indicou não ter havido tampouco uma diferença significativa entre eles ($p=0,395$). Esses resultados indicam que a submissão ao PE não teve efeito sobre o desempenho discriminativo nos diferentes intervalos empregados. Discute-se a validade do modelo CMS.

Palavras-chave: Análise do Comportamento, Chronic Mild Stress, controle de estímulos, sacarose, ratos, desempenho discriminativo.

Abstract

Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987) verified that rats which at first showed a preference for sweetened water to pure water when exposed to a set of moderated and uncontrollable stressors stimuli – called Chronic Mild Stress (CMS) decreased their preference, considered by these authors an indicator of anhedonia. Several studies have not been able to replicate these data neither assessing preference for sweetened water using the same testes used by Willner et al. (1987), not when using other procedures involving instrumental responses. The analysis of researches on this area points to several aspects which varied in the different studies as the quantity of preference tests, the reinforcement schedules, the animals conditions of deprivation, the components of the Stressors Protocol (SP). Rocha (2013) presented data suggesting that SP can spoil the acquisition of an operant discrimination, but these results were not replicated by Fonseca Júnior, Castelli & Oliveira (2015). The comparison between these two studies shows that the time interval between the end of SP and the beginning of the discriminative training was different, once Rocha (2013) started discriminative training the day after SP was finished and Fonseca Jr. et al. (2015) waited 35 day after SP was done. The present work aimed to assess if submission to SP would differentially affect acquisition of a discriminative performance depending on time interval between the end of SP and the beginning of the discriminative training. Thus, three time intervals of 1, 15 and 35 days were compared. Results showed that the weights of animals submitted SP decreased significantly ($p=0,000$) when SP was in effect, compared to control subjects (not submitted to SP). The consumption of water-sucrose solution increased significantly for the animals submitted to SP ($p=0,000$), contrary to what is predicted by anhedonia model proposed by Willner et al. (1987). The weekly food and water consumption in cage also increased when SP was in effect. The comparison of the percentage of responses in presence of S+ in the first three sessions of the discriminative training made by the Kruskal-Wallis test indicated no significant difference on the performance of the four groups in the beginning of the discriminative training ($p=0,860$). An equivalent analysis was done comparing discriminative indexes on the three last sessions of the discriminative training, and

indicated neither significant difference between them ($p=0,395$). These results indicate that the submission to SP had no effect on the discriminative performance when different time intervals were used. Validity of the CMS model is discussed.

Key-words: Behavior Analysis, Chronic Mild Stress, stimulus control, sucrose, rats, discriminative performance.

Os efeitos do CMS sobre controle de estímulos também foram investigados em dois estudos (Rocha 2013; Fonseca Junior et al., 2015)

Na pesquisa de Rocha (2013) 13 ratos foram privados de água a fim de manter os seus pesos entre 80 a 85% ad lib. e foram divididos em quatro condições, a saber: (1) um sujeito foi submetido apenas aos testes de consumo e preferência de líquidos com duas garrafas (água e água com 2% de sacarose), (2) quatro foram submetidos aos testes de consumo e preferência de líquidos e ao Protocolo de Estressores, (3) quatro foram submetidos às mesmas condições do segundo grupo e a um treino discriminativo, um dia após o término do protocolo e (4) quatro sujeitos foram submetidos apenas aos testes de consumo e preferência de líquidos e ao treino discriminativo um dia após o término do protocolo. O Protocolo de Estressores empregado foi similar ao utilizado por Willner et al. (1987). A resposta de pressão à barra foi modelada no dia seguinte ao término do Protocolo de Estressores e imediatamente deu-se início ao treino discriminativo que consistia na apresentação de um esquema múltiplo (FR4-EXT) no qual a luz foi associada com o reforço água (S+) e a ausência de luz (S-) associada à Extinção. Cada componente do esquema múltiplo foi apresentado por 60 segundos e a sessão terminava após 50 reforços obtidos. O treino discriminativo terminava quando o sujeito apresentava 80% das respostas no componente (S+) em duas sessões consecutivas. Depois disso, uma sessão de teste de generalização foi realizada. De modo geral, os resultados não indicaram uma redução no consumo de água com sacarose nos testes de consumo e preferência por água com sacarose após a submissão dos sujeitos ao PE.

Os sujeitos do grupo submetido ao Protocolo de Estressores e ao treino discriminativo precisaram, em média, do dobro do número de sessões (14 sessões) de treino discriminativo para atingir o critério de aprendizagem em comparação ao grupo que não passou pelo Protocolo de Estressores. Rocha (2013) concluiu que o Protocolo de

Estressores não afetou o consumo de água com sacarose, mas interferiu na aquisição de uma discriminação simples. Na sessão de Generalização de Estímulos, foi possível observar que os sujeitos expostos ao Protocolo de Estressores apresentaram uma frequência maior do responder nas intensidades de 50%, 75% e 100% do estímulo luz em comparação com os sujeitos que não foram expostos ao protocolo.

Fonseca Júnior et al. (2015) que também investigaram os efeitos do *Chronic Mild Stress* no estabelecimento de uma discriminação simples obtiveram resultados diferentes. Doze ratos tiveram livre acesso à água e à comida ao longo de todo estudo, exceto nos períodos de privação de água e de ração previstos no protocolo, antes dos testes de preferência de líquidos e no treino discriminativo. Os animais foram separados em dois grupos, a saber: (1) seis sujeitos foram submetidos aos testes de ~~consumo~~ e preferência de líquidos com duas garrafas (água e água com 2% de sacarose) e ao treino discriminativo e (2) seis sujeitos foram submetidos às mesmas condições descritas acima além de serem submetidos ao PE. O protocolo empregado foi similar ao utilizado por Willner et al (1987). Cinco semanas após o término do Protocolo de Estressores, a resposta de pressão à barra foi modelada e deu-se início ao treino discriminativo. Foram realizadas 10 sessões em esquema múltiplo no qual o estímulo luz (S+) era associado ao estímulo reforçador água e a ausência de luz (S-) era associada à extinção. Nas cinco sessões iniciais empregou-se o esquema múltiplo FR3-EXT e nas cinco sessões finais o esquema múltiplo FR4-EXT. Cada componente teve duração de um minuto e em cada sessão ocorriam 20 exposições a cada componente. O índice de 80% de respostas emitidas no componente (S+) foi o critério de aprendizagem.

Assim como no estudo de Rocha (2013), os resultados de Fonseca Júnior et al. (2015) não indicaram uma redução no consumo de água com sacarose após a exposição ao Protocolo de Estressores. Diferentemente dos resultados de Rocha (2013), no estudo

de Fonseca Júnior et al. (2015) não houve diferença significativa entre os grupos na aquisição no número de sessões para o alcance do critério da discriminação.

Fonseca Júnior et al. (2015) observaram uma maior frequência de respostas de pressão à barra nos sujeitos submetidos ao Protocolo de Estressores. Os autores chamaram a atenção para o fato de que o treino discriminativo aconteceu cinco semanas após o término do protocolo, intervalo muito maior do que aquele empregado por Rocha (2013) de apenas um dia e levantaram a hipótese de que a maior frequência de pressão à barra para os sujeitos submetidos ao PE poderia ser um efeito a longo prazo do CMS.

O presente trabalho foi planejado para avaliar a influência do intervalo de tempo entre o término do PE e o início do treino discriminativo na aquisição de uma discriminação simples, submetendo ratos a um procedimento de discriminação 1, 15 e 35 dias após o término do Protocolo de Estressores. No Estudo II, optou-se por adotar o procedimento mais próximo de Fonseca Júnior et al. (2015) e de Rocha (2013), uma vez que a variável principal de interesse era o intervalo entre o fim do PE e o início do treino discriminativo. O esquema de privação do presente estudo foi de 23h de privação de água e de ração antes dos testes de preferência de líquidos + privação de água e de ração contida no protocolo.

Método

O presente trabalho foi aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética e no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo). Número do processo: 26/2019. (Apêndice B)

Sujeitos

Participaram deste estudo 16 ratos machos da raça *Wistar*, experimentalmente ingênuos, provenientes do laboratório de Psicologia Experimental da PUC-SP.

Os sujeitos foram nomeados de S1 a S16 e foram distribuídos em quatro grupos de forma aleatória por meio de um aplicativo (Gerador aleatório) para plataforma *Android* que sorteia números. Os sujeitos S2, S4 e S8 foram designados para o Grupo Controle (GC), os sujeitos S1, S3, S5 e S7 foram designados para o Grupo de Discriminação 1 (GD1), os sujeitos S9, S11, S13 e S15 foram designados para o Grupo de Grupo de Discriminação 15 (GD15) e os sujeitos S10, S12, S14 e S16 foram designados para o Grupo de Discriminação 35 (GD35). Em função da morte de um sujeito (S6) apenas três sujeitos compuseram o Grupo Controle.

Ambiente, Materiais e Equipamentos

Foram utilizadas duas salas do biotério de Psicologia Experimental da PUC-SP. O ciclo luminoso foi de 12 horas claro e 12 horas de escuro, regulado por *timer* automático (exceto durante período de estressores no qual houve períodos de iluminação contínua). A temperatura e a umidade foram aferidas diariamente, por meio de dois termo-higrômetros acoplados um em cada sala.

Balança: foi utilizada uma balança digital, com precisão de 0,5g, utilizada para aferição do peso, ração e consumo de água e água com sacarose dos sujeitos.

Garrafas: foram utilizadas 32 garrafas de plástico com capacidade para 250 ml com bico regulador de saída de líquido para disponibilizar os líquidos para os animais.

Proveta: foi usada para medir as quantidades disponibilizadas e consumidas de água e de água com sacarose.

Luxímetro: modelo MLM-1011-Minipa foi utilizado para garantir a mesma intensidade de luz nas duas salas utilizadas no presente experimento.

Decibelímetro: modelo 407727-Extech foi utilizado a fim de garantir que o estressor barulho tivesse a intensidade de 85 decibéis.

Caixas viveiro: feita de material plástico e dimensões 30 cm (Largura) x 45 cm (Profundidade) x 16 cm (Altura).

Gaiola viveiro: 16 gaiolas de aço inox com dimensões de 20 cm (Largura) x 30 cm (Profundidade) x 21 cm (Altura).

Solução água-sacarose: foi utilizada a quantidade de 2 gramas de sacarose diluída em 98 ml de água para a composição de 100 ml de solução água-sacarose

Caixa operante: Caixas de condicionamento operante, modelo INSIGHT- EP101 – com as seguintes dimensões: 310 mm altura x 260 mm frente x 225 mm fundo conectadas a um controle externo com recursos de registro automático.

Sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores: Os animais submetidos ao protocolo permaneceram em uma sala isolada do Laboratório de Psicologia Experimental PUC-SP, medindo 0,90m de largura x 2,0m de profundidade x 2,80m de altura.

Procedimento

Após completarem 60 dias de vida, os ratos foram alojados individualmente e foram pesados diariamente e tiveram os consumos de água e de ração na gaiola-viveiro mensurados diariamente. Todos os sujeitos foram submetidos a 23 horas de privação de

água e de ração apenas antes dos testes de consumo - esquema de privação idêntico ao empregado por Willner et al. (1987).

Testes de consumo e de preferência de líquidos

Testes com uma garrafa. Quando os sujeitos completaram 90 dias de vida foi realizado a primeira exposição à solução sacarose à semelhança do que ocorreu no estudo de Willner et al. (1987). Foi colocada na gaiola viveiro uma garrafa contendo 100 ml de solução sacarose durante um período de 24 horas do lado esquerdo da parede frontal da gaiola viveiro, a 5 cm da base da gaiola. No dia seguinte o mesmo procedimento foi realizado, mas a garrafa foi colocada no lado direito, também a 5 cm da base da gaiola. O consumo do líquido foi calculado levando em consideração a quantidade disponibilizada e a sobra do líquido ao término do período de 1 hora. Todos os testes foram realizados no mesmo horário (11h) e dia da semana (terça-feira).

Testes com duas garrafas (Teste de consumo). Quarenta e oito horas após a segunda exposição à solução sacarose, foi realizado o primeiro teste com duas garrafas, uma contendo 100 ml de água pura e a outra 100 ml solução sacarose com o objetivo de avaliar a preferência dos animais conforme recomendação de Willner (1997). Foram realizados 19 testes com duas garrafas, uma vez por semana, quatro antes, seis durante e nove depois da submissão ao PE. Cada teste teve duração de 1 hora e as garrafas foram disponibilizadas na gaiola viveiro de forma simultânea (duas garrafas acopladas ao mesmo tempo), equidistantes das laterais da caixa, a 5 cm da base da gaiola, e os lados de apresentação das garrafas foram alternados a cada teste. Todos os sujeitos passaram pelos 19 testes de consumo.

Consumo de ração e de água na gaiola-viveiro

O consumo de ração na gaiola-viveiro foi mensurado levando em consideração a quantidade disponibilizada diariamente (60 gramas) e a quantidade de sobra na gaiola-

viveiro após o período de 24h. O consumo de água na gaiola-viveiro foi avaliado pela diferença entre a quantidade disponibilizada diariamente (100 ml) e a quantidade de sobra na gaiola-viveiro após o período de 24h.

Protocolo de Estressores

Todos os sujeitos, exceto aqueles do GC foram submetidos ao PE. O protocolo adotado no presente estudo foi constituído dos seguintes estímulos estressores: a) luz estroboscópica: localizada no chão da sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores; (b) inclinação da gaiola: a gaiola viveiro foi inclinada em 30° para trás; c) gaiola-viveiro suja: serragem umidecida de água foi colocada no chão da gaiola; d) barulho intermitente - caixa de som *bluetooth*: um ruído branco intermitente de 85 decibéis foi ligado na sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores; e) cheiro: um desodorante purificador de ar com temporizador automático liberou a cada quinze minutos um cheiro na sala onde foi aplicado o protocolo; f) agrupamento: dois sujeitos foram colocados em uma mesma gaiola-viveiro, de modo que um determinado animal recebe-se a visita de um outro animal em sua gaiola-viveiro e vice-versa na exposição seguinte; g) objeto estranho na gaiola: um objeto de plástico redondo (caixa de bala de metal) de 20 cm de diâmetro e 1,5cm de altura foi colocado na gaiola viveiro; h) iluminação contínua: a luz da sala onde foi aplicado o Protocolo de Estressores permaneceu acesa por 19 horas seguidas; (i) privação de água e ração por períodos intermitentes - 17h, 26h e 43h- totalizando 86 horas por semana de privação de água e 23h, 26h e 43h – totalizando 92 horas por semana de privação de ração; (j) acesso restrito de ração: apenas dois gramas de ração serão disponibilizados na gaiola-viveiro, após um período de privação de ração de 23h. A Tabela 5 sumariza a distribuição semanal dos estímulos que compõem o Protocolo de Estressores, conforme proposto por Willner et al. (1987)⁸.

⁸ O estímulo estressor “redução da temperatura da sala a 10°C” não foi utilizado devido às especificidades do laboratório no qual foi realizada a pesquisa.

Sessões operantes

Todos os sujeitos foram submetidos a um regime de privação de água por 23h30 diariamente a partir do 113º dia de coleta. Este dia correspondeu ao término do PE para os sujeitos submetidos a ele (GD1, GD15 e GD35).

Modelagem e fortalecimento da resposta de pressão à barra. O procedimento de modelagem ocorreu em momentos diferentes para os diferentes grupos do presente estudo. Para os sujeitos dos Grupos GC e GD1 a modelagem ocorreu no 114º dia (um dia após o término do PE para o grupo GD1). Para os Grupos GD15 e GD35 a modelagem ocorreu no 128º e 148º dias, respectivamente 15 e 35 dias após o término do PE.

Para todos os sujeitos a resposta de pressão à barra foi automodelada, na condição luz com intensidade de 100% (486 lux), cada resposta produzindo 0,05 ml de água até que 50 reforços fossem obtidos. Os sujeitos foram submetidos a uma sessão em esquema de reforçamento contínuo (CRF), seguido por uma sessão em esquema de reforçamento FR2 e posteriormente por uma sessão em esquema de reforçamento FR4, adotando-se como critério de término das sessões a obtenção de 50 reforços.

A Tabela 6 apresenta as diferentes condições experimentais empregadas em cada grupo.

Treino Discriminativo. Durante o treino discriminativo todos os animais foram privados de água durante 23h30 diariamente, exceto nos dias que antecediam os testes de consumo nos quais permaneciam privados de água e de ração por 23h à semelhança do que ocorreu no estudo de Willner et al. (1987). Ao término de cada sessão os animais tinham livre acesso à água na gaiola-viveiro por 30 minutos e em seguida eram privados somente de água por 23h30.

Tabela 6.

Diferentes Condições Experimentais Empregadas em Cada Grupo.

Grupo	Foi submetido ao Protocolo de Estressores?	Data de início do treino discriminativo.
Grupo Controle (GC) S2, S4 e S8	Não	Um dia após o término do PE para os grupos GD1, GD15 e GD35.
Grupo Discriminação 1 (GD1) S1, S3, S5 e S7	Sim	Um dia após o término do PE (=GC)
Grupo Discriminação 15 (GD15) S9, S11, S13 e S15	Sim	15 dias após o término do PE
Grupo Discriminação 35 (GD35) S10, S12, S14 e S16	Sim	35 dias após o término do PE

Após as três sessões nas quais a resposta de pressão à barra foi reforçada nos esquemas CRF, FR2 e FR4, iniciou-se o treino discriminativo que consistiu em reforçar a resposta de pressão à barra na condição luz (S+) com o esquema FR4 e não reforçar esta resposta na ausência de luz (S-). Cada componente do esquema múltiplo durou 60 segundos, e os componentes foram apresentados de forma aleatória, de modo que o mesmo componente não pudesse ser apresentado mais do que três vezes seguidas à semelhança do que ocorreu no estudo de Fonseca Júnior et al. (2015) começando-se cada sessão sempre com o componente (S+). As sessões foram realizadas diariamente, exceto às terças (dia em que eram realizados os testes de consumo) e o critério de encerramento de cada sessão foi a obtenção de 50 reforços ou após 40 minutos de sessão, o que ocorresse primeiro. Essa fase foi finalizada após cada animal ser submetido a oito sessões.

Teste de Generalização. Após o término do treino discriminativo, todos os sujeitos foram expostos a uma sessão em que foram apresentadas diferentes intensidades de luz,

a saber, 0% (0 lux), 25% (16 lux), 50% (112 lux), 75% (277 lux) e 100% (486 lux) na condição de extinção. Cada intensidade de luz foi apresentada por 30 segundos seis vezes em ordem aleatória e a duração da sessão foi de 15 minutos.

Análise Estatística. Foram empregados os testes não paramétricos de *Friedman* para analisar as medidas de peso, o consumo de líquidos nos testes de consumo e o consumo semanal de água e de ração na gaiola-viveiro e de *Kruskal-Wallis* para comparar os índices discriminativos dos quatro grupos adotando-se como o nível de significância $p \leq 0,05$.

Resultados

A Figura 5 apresenta os pesos dos sujeitos ao longo do estudo e as médias referentes aos 71 primeiros dias, aos 42 seguintes e aos 64 últimos (que correspondem aos períodos antes, durante e depois do PE aplicado aos grupos GD1, GD15 e GD35)

Como se pode ver, os sujeitos do GC (que não foram submetidos ao PE) não variaram muito os seus pesos. Comparando as médias dos pesos dos sujeitos desse grupo nos três períodos mencionados (que correspondem aos períodos antes, durante e depois do PE aplicado aos demais grupos) verificou-se por meio do teste de Friedman não ter ocorrido diferença significativa ($p=0,097$). Diferentemente, a comparação das médias dos pesos dos demais sujeitos (GD1, GD15 e GD35), nesses três momentos, mostrou ter ocorrido uma diferença significativa com os menores valores em vigência do PE ($p=0,000$).

Na Figura 6 são apresentados o consumo de água e o de solução água-sacarose pelos animais nos 19 testes realizados ao longo do estudo.

Para os sujeitos do grupo GC que não foram submetidos ao PE, é possível observar que o consumo solução água-sacarose foi maior que o consumo de água em todos os testes realizados, exceto no 6º teste do S2 no qual o consumo de água foi maior do que o consumo de solução sacarose e no 7º teste do S8 no qual o consumo foi igual para ambos os líquidos.

Para os sujeitos do demais grupos (GD1, GD15 e GD35), que foram submetidos ao PE, observa-se em geral uma preferência pela solução água-sacarose, exceto para o S11 que a partir do 6º teste não apresentou diferença no consumo dos dois líquidos, para o S3 que em três testes (1º, 6º e 7º) e para S9 que em dois testes (2º e 3º) tiveram o mesmo consumo para ambos os líquidos e para S7 que no 8º teste preferiu água.

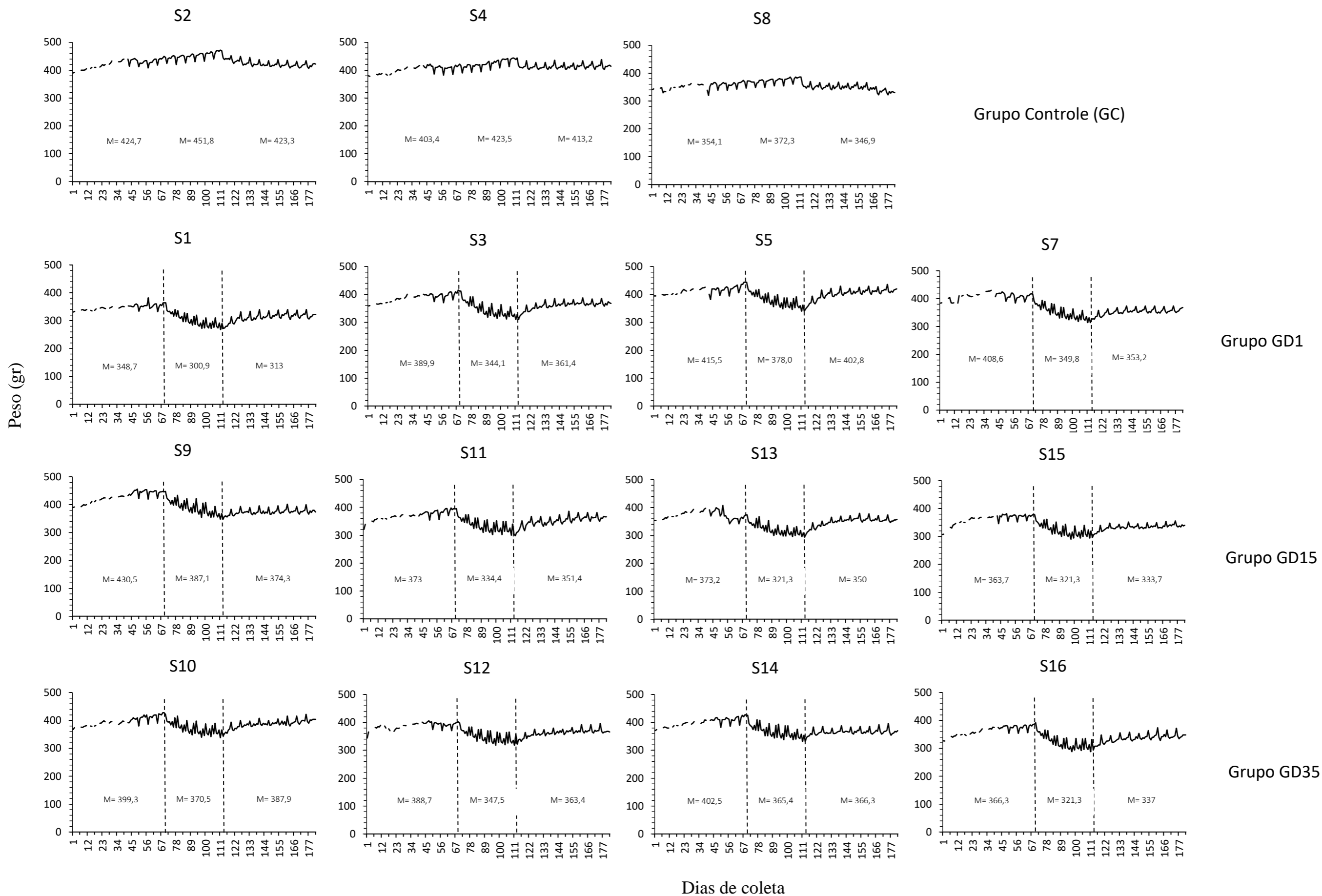


Figura 5. Pesos corporais de cada sujeito ao longo do estudo. As linhas verticais pontilhadas sinalizam o período de vigência do Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo)

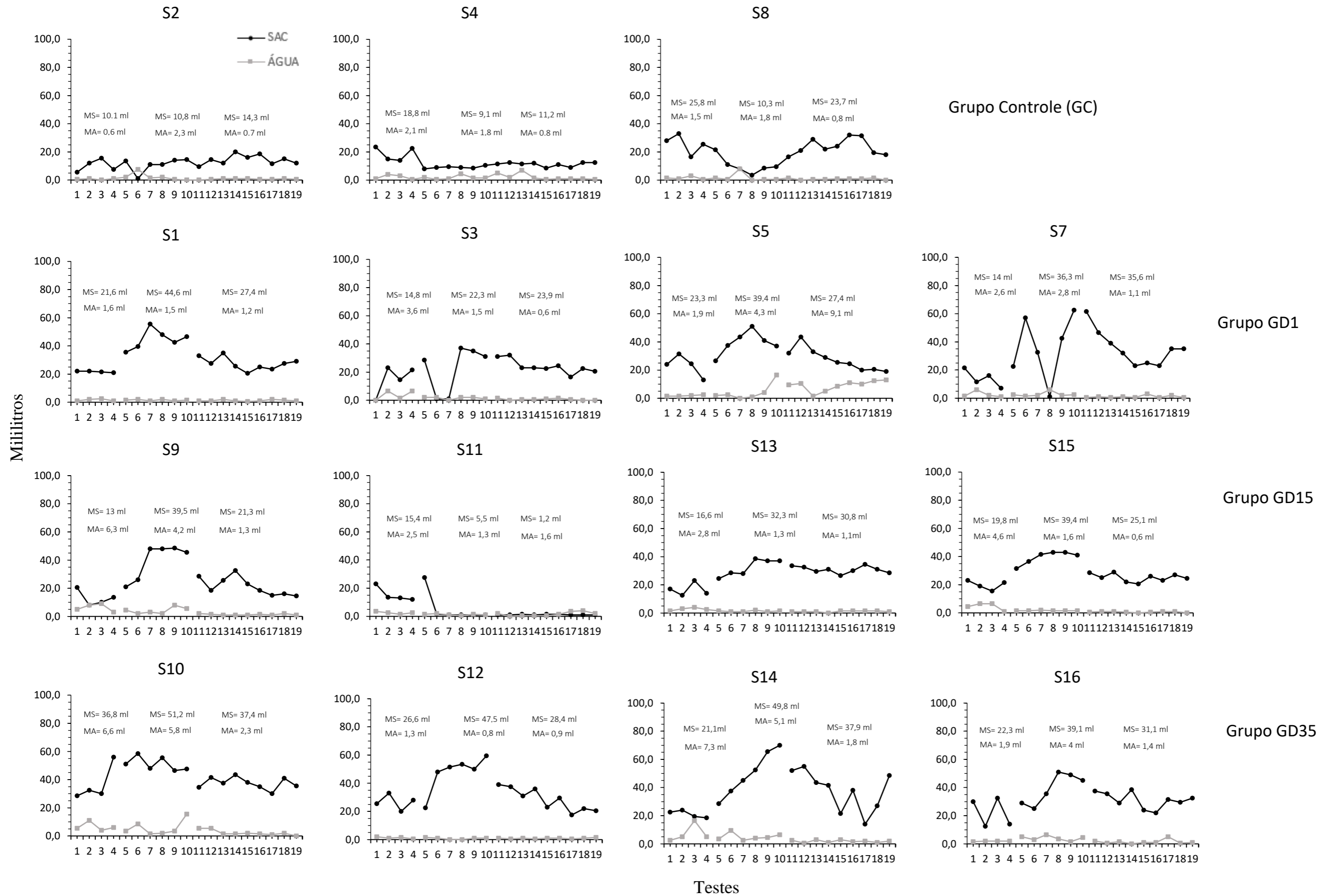


Figura 6. Consumo de água e de água com sacarose de cada sujeito ao longo do estudo. Os espaços entre as linhas horizontais correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias de consumo de água com sacarose (MS) e água (MA) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

A comparação do consumo da solução sacarose antes, durante e depois do PE para os sujeitos experimentais (GD1, GD15 e GD35) mostrou ter ocorrido uma diferença significativa ($p=0,000$) com os maiores valores em vigência do PE. Diferentemente, o consumo de solução sacarose nesses três momentos pelos sujeitos do grupo GC não apresentou uma diferença significativa ($p=0,368$).

Na Figura 7 são apresentadas as médias semanais de consumo de ração na gaiola-viveiro pelos animais ao longo do estudo. Pode-se observar que para os sujeitos do GC (que não foram submetidos ao PE) ocorreu um consumo estável ao longo das 20 semanas analisadas. Entretanto, para os sujeitos dos demais grupos (GD1, GD15 e GD35) que foram submetidos ao PE, nota-se que o consumo de ração na gaiola-viveiro aumentou de forma abrupta logo que o PE foi introduzido, exceto para o S1, que apresentou um aumento gradual ao ser exposto ao PE.

A comparação do consumo semanal de ração na gaiola-viveiro antes, durante e depois do PE para os sujeitos experimentais mostrou ter ocorrido uma diferença significativa ($p=0,000$) com os maiores valores em vigência do protocolo. Uma comparação similar realizada para o grupo GC também apontou uma diferença significativa ($p=0,050$) com os menores valores durante o período de vigência do PE para os sujeitos experimentais.

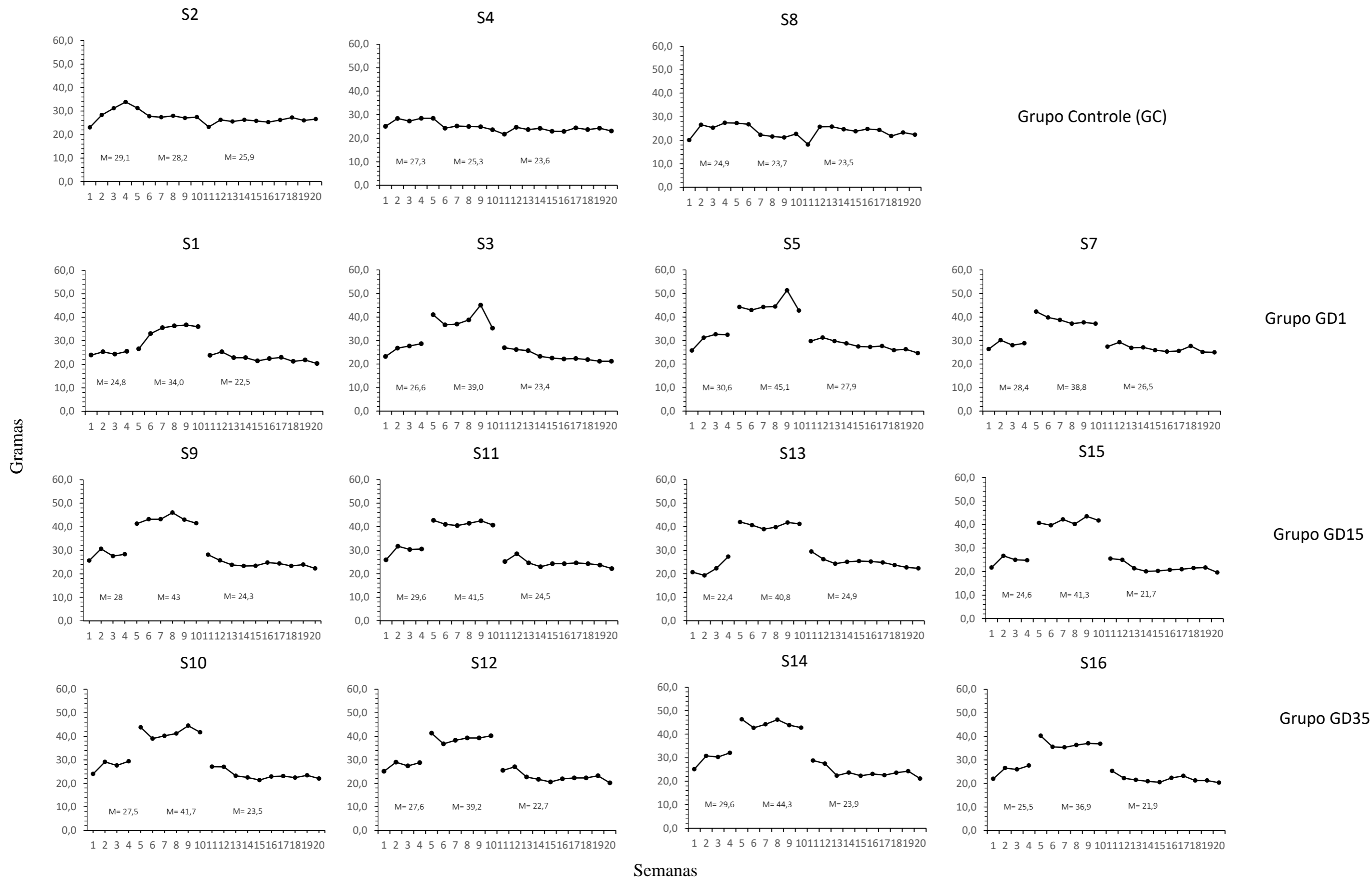


Figura 7. Média semanal de consumo de ração dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo).

Com o objetivo de analisar o consumo semanal de água na gaiola-viveiro pelos animais ao longo do estudo, construiu-se a Figura 8. A seta localizada na 11^a. semana indica o momento a partir do qual ocorreu restrição hídrica de 23h30 diariamente para todos os sujeitos. Como se pode ver, para todos os sujeitos do GC que não foram submetidos ao PE, o consumo de água semanal na gaiola-viveiro permaneceu similar até a 10^a. semana (que corresponde ao término do PE aplicado aos demais grupos). Após esse período, ocorreu uma redução na média de consumo semanal de água em comparação com os outros dois períodos mensurados (antes e durante) para os sujeitos S2 e S4 ao passo que para o sujeito S8, houve um aumento.

Para os sujeitos do demais grupos (GD1, GD15 e GD35), que foram submetidos ao PE, em geral houve um aumento no consumo de água na gaiola-viveiro em vigência do PE.

A comparação do consumo de água na gaiola-viveiro antes, durante e depois do PE para os sujeitos experimentais mostrou ter ocorrido uma diferença significativa ($p=0,000$) com os maiores valores em vigência do protocolo. Diferentemente, essa mesma comparação realizada para o grupo GC não apontou uma diferença significativa no consumo de água nesses três momentos ($p=0,717$).

Na Figura 9 são apresentadas as porcentagens de respostas na condição luz (S+) pelos animais durante as sessões de discriminação e as porcentagens médias das três primeiras e das três últimas sessões.

A análise da Figura 9 indica que os sujeitos S4, S8 e S2 do grupo GC (que não foram submetidos ao PE e que iniciaram o treino discriminativo um dia após o término do período do PE aplicado aos demais grupos) apresentaram um desempenho similar nas três primeiras sessões do treino discriminativo tendo apresentado uma média de 53%, 54% e 66% das respostas na presença de S+, respectivamente. Nas últimas três sessões

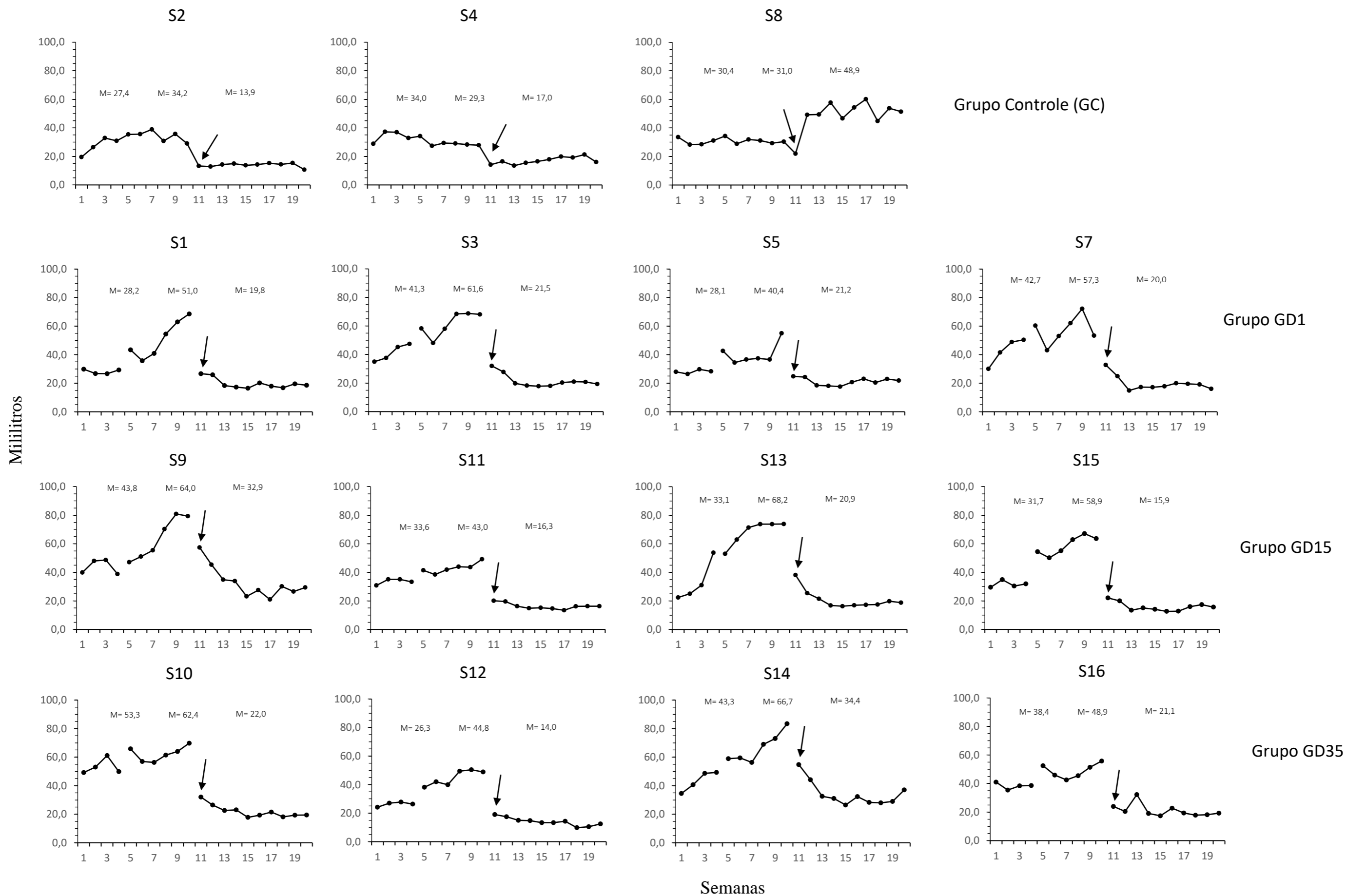


Figura 8. Média semanal de consumo de água dos sujeitos na gaiola-viveiro. Os espaços entre a linha horizontal correspondem ao período de exposição ao Protocolo de Estressores. As médias (M) correspondem aos três períodos avaliados (antes, durante e após o protocolo). A seta indica a primeira semana em vigência da restrição hídrica por 23h30 diariamente para todos os sujeitos até o final do estudo.

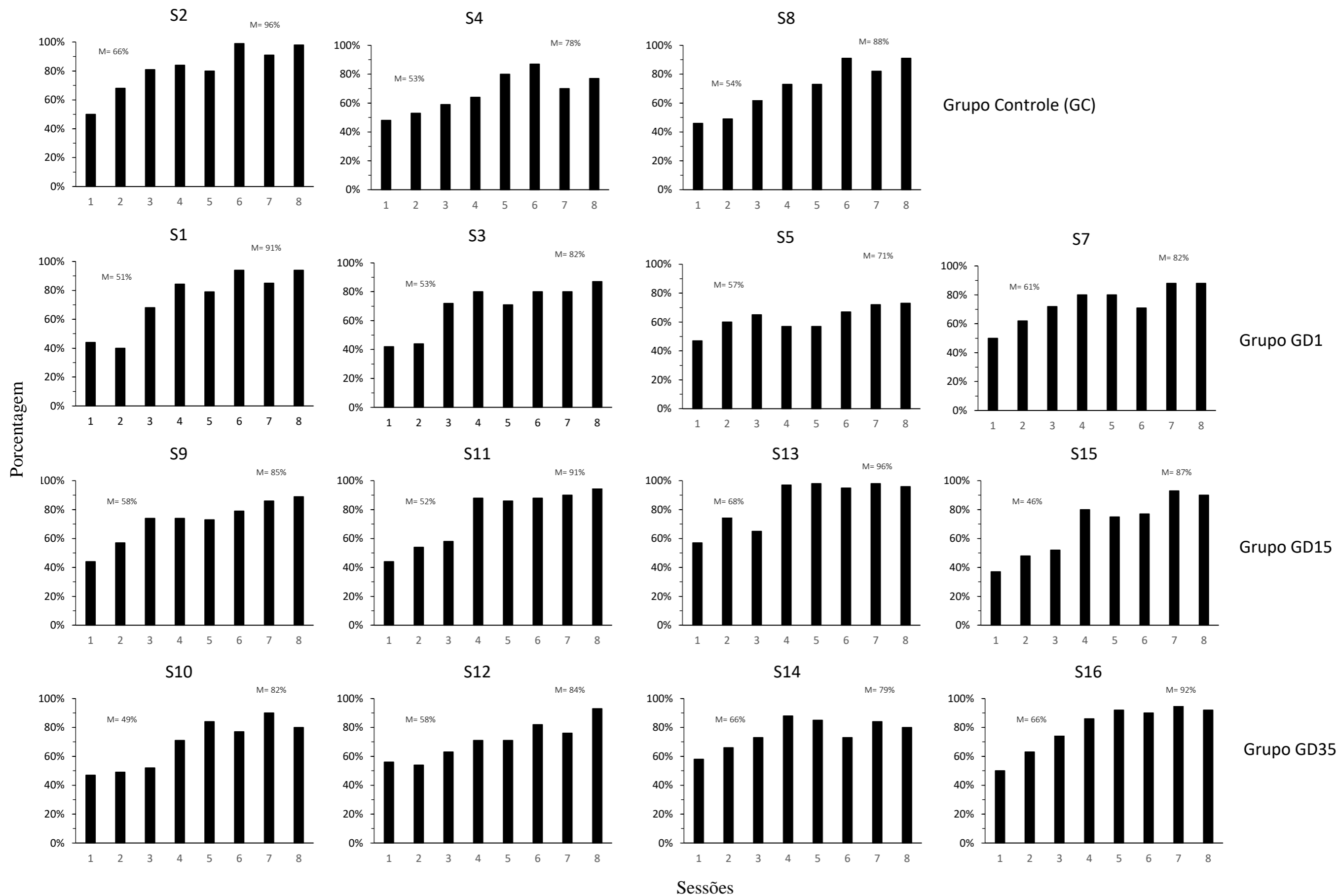


Figura 9. Porcentagem de respostas dos sujeitos na condição luz, ao longo de oito sessões de discriminação. A linha horizontal indica o critério de aprendizagem (índice discriminativo) estabelecido no presente estudo. As médias (M) correspondem aos índices discriminativos em dois períodos avaliados (três sessões iniciais e três sessões finais).

observa-se um aumento para 78%, 88% e 96% para os sujeitos S4, S8 e S2, respectivamente.

Para os sujeitos do grupo GD1 que foram submetidos ao PE e que iniciaram o treino discriminativo um dia após o término do protocolo, é possível observar que as porcentagens médias de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões variaram entre 51% (S1) e 61% (S7), tendo esses índices alcançado valores entre 71% (S5) e 91% (S1) nas três últimas sessões.

Para os sujeitos do grupo GD15 que foram submetidos ao PE e que iniciaram o treino discriminativo 15 dias após o término do protocolo, é possível observar que as porcentagens médias de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões variaram entre 46% (S15) e 68% (S14), ao passo que nas três últimas sessões variaram entre 85% (S9) e 96% (S13).

Para os sujeitos do grupo GD35 que foram submetidos ao PE e que iniciaram o treino discriminativo 35 dias após o término do protocolo, é possível observar que as porcentagens médias de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões variaram entre 49% (S10) e 66% (S14 e S16), ao passo que nas três últimas sessões variaram entre 79% (S14) e 92% (S16).

A comparação das porcentagens de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões do treino discriminativo pelo teste *Kruskal-Wallis* indicou não haver uma diferença significativa no desempenho dos quatro grupos no início do treino ($p=0,860$). Uma análise equivalente foi feita comparando-se os índices discriminativos nas três últimas sessões do treino, indicando não ter havido tampouco uma diferença significativa entre eles ($p=0,395$).

A Figura 10 mostra o desempenho de cada sujeito durante o teste de generalização de estímulos na condição de extinção após as oito sessões de treino discriminativo.

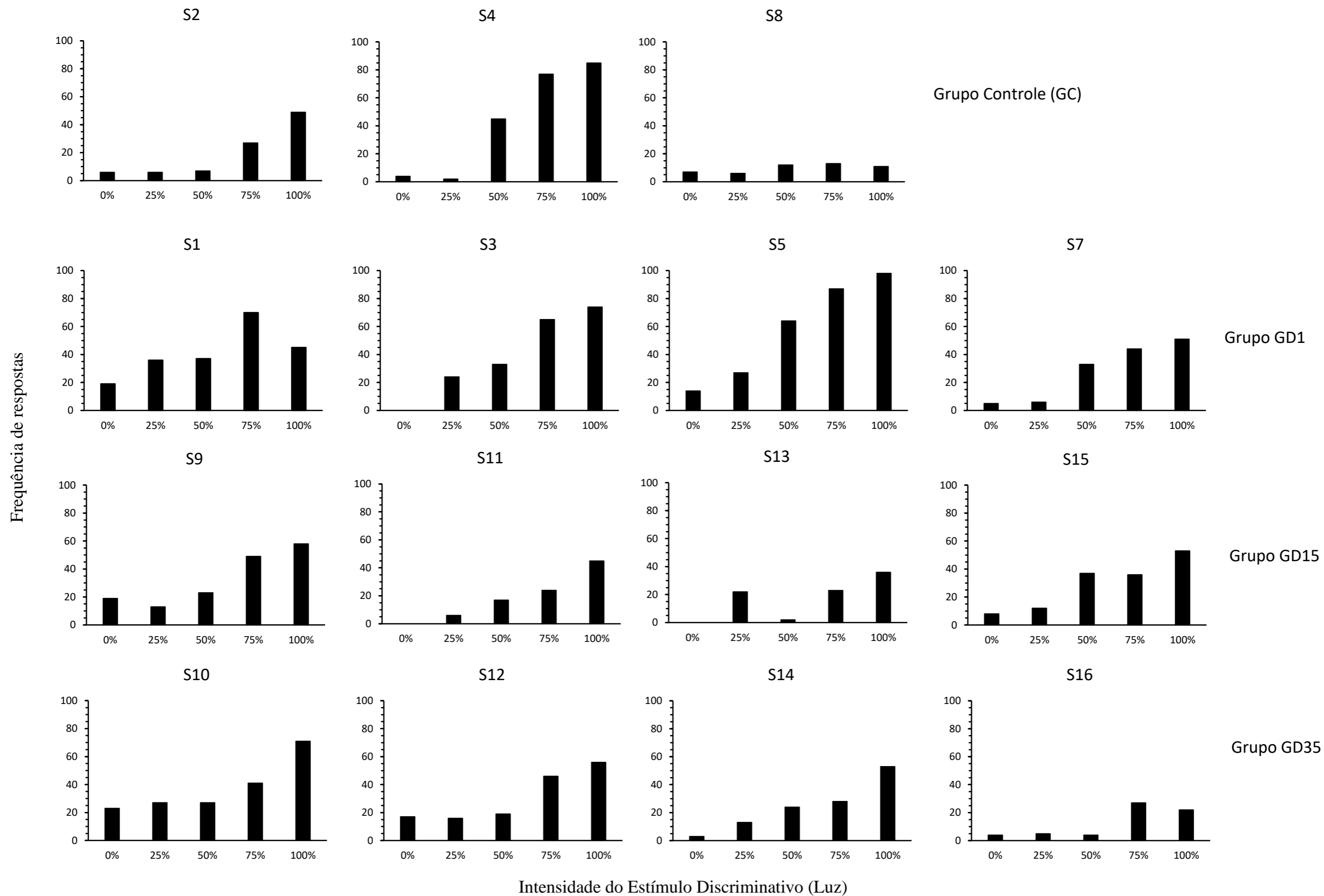


Figura 10. Frequência de respostas dos sujeitos nas diferentes intensidades do estímulo ao longo de uma sessão de generalização em extinção.

De modo geral, é possível observar que, independentemente do grupo no qual os sujeitos estavam inseridos, no teste de generalização a frequência de respostas foi maior nas intensidades de 100% e 75% para todos os sujeitos, exceto para os sujeitos S1, S8 e S16 que apresentaram uma maior frequência de respostas na intensidade de 75%.

Discussão

Os dados do presente estudo mostraram que em vigência do PE os pesos corporais dos sujeitos diminuíram significativamente em comparação com os sujeitos não submetidos ao protocolo, replicando os resultados observados nos estudos de Willner et al. (1987), Thomaz, (2001;2009), Dolabela (2004), Rodrigues (2005), Cardoso (2008), Oliveira (2009), Pereira (2009), Almeida (2013), Lacerda (2013), Rocha (2013), Fonseca Júnior et al. (2015) e para o grupo G2 do Estudo I do presente trabalho. Deve-se ressaltar que em todos esses estudos, os animais foram submetidos à privação de água e de ração como componentes do PE. Por outro lado, os dados observados nos estudos de Pereira (2009), de Silva e Malerbi (2018) e aqueles do grupo G4 do Estudo I que não adotaram privação de água e de ração como componentes do PE obtiveram resultados diferentes, o que indica que a condição de privação deve ter sido a variável crítica para a redução de peso corporal observada em vigência do PE.

Os testes de consumo de líquidos no presente estudo indicaram que não houve redução no consumo de solução água-sacarose em vigência do PE, isto é, não foi observado o indicador de anedonia proposto por Willner et al. (1987). Durante o PE para 11 dos 12 sujeitos experimentais houve, ao contrário, um aumento significativo ($p=0,000$) no consumo de solução água-sacarose, à semelhança do que ocorreu em outros estudos (Almeida, 2013; Bissete, Frederick & Halaris, 1999; Cardoso, 2008; Hatcher et al. 1996; Lacerda, 2013; Murison & Hansen, 2001; Oliveira, 2009; Silva & Malerbi, 2018; Statham, 1997; Thomaz, 2009).

A medida consumatória de solução água-sacarose tem sido objeto de uma discussão que questiona a validade do modelo proposto por Willner (Willner, 1997; 1998; 2005; 2017). O próprio autor deste modelo afirmou que “é claro que as medidas de consumo são inferiores ao ideal como índices de resposta a recompensa” (Willner et al., 1998, p.273).

Vale ressaltar que o sujeito S11 do presente estudo foi o único que apresentou uma redução no consumo de solução água-sacarose a partir do 6º teste (segunda semana em vigência do PE), permanecendo nesse nível de consumo até o fim do estudo. Tal resultado poderia ser interpretado como um indicativo de anedonia. Entretanto a análise visual da Figura 2 indica também uma redução no consumo de solução água-sacarose para dois sujeitos do grupo controle (S4 e S8) – não submetidos ao PE- o que nos faz suspeitar da ocorrência de alguma variável estranha não identificada pelo experimentador.

Silva e Malerbi (2018) sugeriram que o consumo semanal de ração na gaiola-viveiro pudesse ser uma medida alternativa à preferência de solução água-sacarose nos testes realizados com duas garrafas para avaliar os efeitos do PE por terem observado uma redução no consumo semanal de ração na gaiola-viveiro em vigência do PE. A diminuição no consumo semanal de ração na gaiola-viveiro ocorreu apenas para os sujeitos do grupo G4 do presente Estudo I que foram submetidos aos mesmos procedimentos de Silva e Malerbi (2018). Ao contrário, no Estudo II, houve um aumento significativo no consumo semanal de ração na gaiola-viveiro em vigência do PE, o que sugere que também essa medida deva ter sido influenciada pela condição de privação dos animais e não apenas pela submissão ao PE, uma vez que privação de ração foi um dos componentes do PE neste estudo.

Com relação ao consumo semanal de água na gaiola-viveiro, todos os sujeitos do presente estudo apresentaram um aumento significativo em vigência do PE à semelhança

do que foi observado por Almeida (2013), Lacerda (2013), Pereira (2009), Rocha (2013) e Silva e Malerbi (2018) provavelmente devido ao aumento no estado de privação de água decorrente da submissão ao PE. Deve-se se lembrar que a privação de água também foi um dos componentes do PE neste estudo e a literatura tem mostrado exaustivamente que diferentes padrões de consumo estão associados a diferentes procedimentos de privação (Fallon, 1965; Hagan & Moss, 1997; López-Espinoza & Martinez, 2001 e López-Espinoza, Ríos & Soto, 2004).

A comparação das porcentagens de respostas na presença de S+ nas três primeiras sessões apresentadas pelos sujeitos que foram submetidos ao treino discriminativo após diferentes intervalos desde o término da submissão ao PE (grupos GD1, GD15 e GD35) indicou que a esse intervalo não afetou diferencialmente os índices discriminativos. A comparação das porcentagens de respostas dos sujeitos desses três grupos nas três últimas sessões do treino discriminativo tampouco indicou uma diferença significativa.

Portanto, os dados obtidos no presente estudo são diferentes daqueles apresentados por Rocha (2013) que observou que os sujeitos submetidos ao PE levaram em média o dobro de sessões em comparação com o grupo controle para atingir o critério de aprendizagem no treino discriminativo que ocorreu um dia após a submissão ao PE e se assemelham aos resultados encontrados por Fonseca Júnior et al. (2015) - que ocorreu 35 dias após a submissão ao PE- indicando que o PE não afetou o estabelecimento da discriminação simples, independentemente do intervalo entre o término da submissão ao PE e o início do treino discriminativo. Dessa forma, os dados do presente estudo não confirmam a hipótese de Fonseca Júnior et al. (2015) de que o intervalo entre o fim da submissão ao PE e o início do treino discriminativo tenha sido a variável responsável pela diferença de resultados obtidos no seu estudo em relação àqueles obtidos por Rocha

(2013). No presente estudo, diferentes intervalos entre o fim da submissão ao PE e o início do treino discriminativo não afetaram o desempenho discriminativo dos animais.

Recentemente, Pansarim e Schmidt (2019) avaliaram os efeitos do PE sobre uma tarefa de discriminação visual simultânea e tampouco encontraram diferenças significativas entre o grupo submetido ao Protocolo de Estressores e o grupo controle.

O teste de generalização em extinção realizado no presente estudo indicou que nove dos doze sujeitos experimentais apresentaram uma frequência de respostas maior na intensidade de 100%, o que indica que o PE não afetou a generalização de estímulos, diferentemente do que foi observado por Rocha (2013) em cujo estudo dois dos quatro sujeitos submetidos ao PE responderam mais na intensidade de 75% no teste em extinção.

Os dados do presente estudo permitem, portanto, que se conclua que o Protocolo de Estressores proposto por Willner et al. (1987) não foi capaz de produzir uma diminuição de preferência de solução água-sacarose - que seria um indicador de anedonia - nem de afetar a aquisição de um desempenho discriminativo, o que nos leva a questionar a adequação desse protocolo como um modelo experimental de anedonia.

Considerações finais

Numa meta-análise recente, embora Antoniuk et al. (2018) tenham concluído que o CMS pode ser considerado um modelo confiável de anedonia, os autores admitiram a existência de uma alta heterogeneidade nos dados quando são realizadas análises individuais nos subgrupos, o que pode ser atribuído a fatores como natureza, intensidade e cronicidade dos estressores, a possibilidade que os sujeitos têm de controlá-los (e.g. quando o sujeito foge do estressor luz estroboscópica, virando seu corpo na direção contrária), condições de alojamento e características do organismo (e.g., espécie, linhagem, idade), fatores esses que devem ser levados em consideração quando delineado um experimento.

Os dois estudos realizados no presente trabalho obtiveram resultados semelhantes àqueles encontrados na meta-análise supracitada no que diz respeito à dificuldade de replicar os dados encontrados por Willner et al. (1987). Com o PE empregado no presente trabalho, não foi possível observar uma redução na preferência de solução água-sacarose. Entretanto, uma alternativa a essa medida foi apresentada por Silva e Malerbi (2018) que observaram uma redução no consumo semanal de ração na gaiola-viveiro em vigência do PE e os dados obtidos no Estudo I apontam para a adequação dessa medida, pelo menos em algumas condições de privação. A investigação do consumo de ração na gaiola-viveiro parece ser uma alternativa viável em estudos futuros sobre o CMS.

Efeitos do PE sobre a aquisição de uma discriminação simples não foram observados independentemente do intervalo entre o fim da submissão ao PE e o início do treino discriminativo.

Os resultados heterogêneos encontrados na literatura da área sugerem que pesquisas futuras analisem o efeito de cada componente do Protocolo de Estressores sobre as respostas consumatórias e instrumentais. Por exemplo, no estudo de Silva e Malerbi

(2018) uma falha técnica no regulador do ciclo circadiano resultou na exposição acidental do sujeito controle, por três semanas, ao ciclo claro, o que resultou na redução do consumo de solução água-sacarose durante esse período em comparação com o consumo antes e depois da falha. Talvez um estudo sistemático avaliando cada componente do PE possa esclarecer a adequação deste modelo de anedonia.

Referências

- Almeida, N. K. S. P. (2013). *Chronic Mild Stress (CMS) e os efeitos da exposição de sujeitos a um esquema de reforçamento de tempo variável*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5*. 5th.ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.
- Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., & Wlodarczyk, J. (2018). Chronic Unpredictable Mild Stress for Modeling Depression in Rodents: Meta-analysis of Model Reliability. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.12.002
- Barr, A. M., & Phillips, A. (1998). Chronic mild stress has no effect on responding by rats for sucrose under a progressive ratio schedule. *Physiology and Behavior*, 64, 591- 597.
- Bergmann F., Cohen, E. & Lieblich, I. (1984). Biphasic effects of chronic saccharin intake on pain responses of healthy and diabetic rats of two genetically selected strains. *Psychopharmacology*, 82, 248-251. <https://doi.org/10.1007/BF00427783>
- Bissette, G.; Frederick, R.; Halaris, A., 1999: Sertraline reverses neuropeptide changes in discrete brain regions of chronic, mild stress rats. *Society For Neuroscience (Abstracts)*. 25(1-2): 855
- Blass, E., Fitzgerald, E., & Kehoe, P., (1987). Interaction between sucrose, pain and isolation distress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 26, 483-489. [http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90153-5](http://dx.doi.org/10.1016/0091-3057(87)90153-5)

- Cardoso, L. R. D. (2008). *Efeitos do esquema de intervalo variável na preferência e no consumo de líquidos apresentados por ratos submetidos ao chronic mild stress*. Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP.
- D'Aquila P, Newton J, Willner P (1997) Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiology & Behavior*, 62, 421–426
- Dolabela, A. C. F. O. (2004). *Um estudo sobre as possíveis interações entre o Chronic Mild Stress e o desempenho operante*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Fallon, D. (1965). Effects of cyclic deprivation upon consummatory behavior: The role of deprivation history. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 60, 283-287.
- Fonseca Júnior, A. R. F., Castelli, M. C. Z., & Oliveira, E. C. A. (2015). Effects of Chronic Mild Stress on Operant Discrimination Learning. *Behavior Analysis: Research and Practice*, 15, 20-27.
- Grønli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, C. M., & Ursin, R. (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiology & Behavior*, 84, 571–577.
- Hagan, M. M., & Moss, D. E. (1997). Persistence of binge-eating patterns after a history of restriction with intermittent bouts of refeeding on palatable food in rats: implications for bulimia nervosa. *International Journal of Eat Disorder*, 22, 411–420. doi:10.1002/(sici)1098-108x(199712)22:4<411::aid-eat6>3.0.co;2-p

- Hatcher J. P, Bell D. J, Reed T. J., & Hagan J. J (1997) Chronic mild stress-induced reductions in saccharin intake depend upon feeding status. *Journal Psychopharmacology*, *11*, 331-338.
- Johnson D., Soderpalm B., Heilig M., & Engel J.A (1994). Indications of decreased dopamine neurotransmission after chronic unpredictable mild stress in rats. *Psychopharmacology*, *114*, (Abstract) B13
- Katz, R. J. (1982). Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, *16*, 965-968
- Lacerda, L. G. (2013). *Chronic Mild Stress: um estudo sobre interação entre manipulação neonatal e submissão ao protocolo de estressores na vida adulta*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Lieblich, I., Cohen, E., Ganchrow, J. R., Blass, E. M., & Bergmann, F. (1983). Morphine tolerance in genetically selected rats induced by chronically elevated saccharine intake. *Science*, *221*: 871-873. doi: 10.1126/science.6879185
- López-Espinoza, A. & Martínez, H. (2001). Efectos de dos programas de privación parcial sobre el peso corporal y el consumo total de agua y comida en ratas. *Acta Comportamental*, *9* (1), 5-17.
- López-Espinoza, A., Rios, A., Soto, M. E. (2004). Efectos de la privación de agua em um programa de reforzamiento IV 5' sobre o peso corporal, el consumo de agua y alimento en ratas. *Acta Comportamental*, *12* (2), 157-170.

- Muscat, R. & Willner, P. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 507-517
- Murison, R., & Hansen, A. L. (2001). Reliability of the Chronic Mild Stress paradigm: Implications for research and animal welfare. *Integrative Physiological & Behavioral Science*, 36(4), 266–274.
- Oliveira, A. C. F. (2009). *Estresse Moderado Crônico: Efeitos sobre a atividade geral em ratos*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília.
- Pansarim, V., & Schmidt, A. (2019). Efeitos do Estresse Crônico Moderado sobre o Desempenho de Ratos Wistar em Tarefas de Aprendizagem. *Interação em Psicologia*, 23(2). doi:<http://dx.doi.org/10.5380/psi.v23i02.58030>
- Pereira, C. M. (2009). *Chronic Mild Stress: um estudo sob a interação entre submissão ao protocolo de estressores, comportamento operante e privação*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Pereira, C. M. (2015). *Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água em ratos*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rocha, L. M. (2013). *Os efeitos da submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) no estabelecimento de uma discriminação simples*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Rodrigues, M. B. (2005). *Interações entre o Chronic Mild Stress e o Desempenho Operante: uma Replicação de Dolabela (2004)*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

- Segato, F. N., Castro Souza, C., Segato, E. N., Morato, S. & Coimbra, N. C. (1997). Sucrose ingestion causes opioid analgesia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 981-984. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000800011>
- Silva, P., & Malerbi, F. (2018). Efeitos do protocolo de estressores sobre a preferência de água com sacarose em ratos. *Revista Brasileira de Análise do Comportamento*, 14 (2). doi:<http://dx.doi.org/10.18542/rebac.v14i2.7530>
- Statham A. (1997). Large scale study of the replicability of the chronic mild stress model of depression. *Psychopharmacology*; 11 (suppl): A41
- Thomaz, C. R. C. (2001). *O Efeito da Submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) sobre o Valor Reforçador do Estímulo*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Thomaz, C. R. C. (2009). *Possíveis inter-relações entre a submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) e o desempenho operante*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Willner, P., Towell, D., Sampson, S., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93, 358-364.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, pp. 319-329.

- Willner, P., Benton, D., Brown, E., Survijt, C., Davies, G., Morgan, J., Morgan, M. (1998). “Depression” increases “craving” for sweet rewards in animal and human models of depression and craving. *Psychopharmacology*, 136, 272–283.
- Willner, P. (1999) Strengths and limitations of the chronic mild stress (CMS) model of depression. *Behavioural Pharmacology*, 10 (supplement) doi: 10.1097/00008877-199908001-00258.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52, 90-110.
- Willner, P. (2017) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6, 78-93.
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>

Apêndice A



Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Humanas e da Saúde
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Consumo de água e de água com sacarose em ratos submetidos ao protocolo de estressores e diferentes regimes de privação”, registrada com o nº 0018/16, sob a responsabilidade de Paulo Eduardo Silva e Fani Malerbi - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FaCHS...) da Faculdade de Ciências Humanas e da Saúde da PUC/SP, em reunião de 24/11/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro de 2017
Espécie/linhagem/raça	Ratos wistar
Nº de animais	16
Peso/Idade	3 meses
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Laboratório de Psicologia Experimental: Análise do Comportamento

Apêndice B



Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Humanas e da Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos dos estressores crônicos e moderados sobre a aquisição de uma discriminação simples após diferentes intervalos dado o término do protocolo de estressores", registrada com o nº 26/2019, sob a responsabilidade de Paulo Eduardo da Silva e Prof. Dra. Fani Eta Korn Malerbi - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FaCHS...) da Faculdade de Ciências Humanas e da Saúde da PUC/SP, em reunião de 08/maio/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogêneo Wistar
Nº de animais	16
Peso/Idade	170 gramas/60 dias
Sexo	Macho
Origem	Laboratório de Psicologia Experimental da PUC-SP

São Paulo, 19 de novembro de 2019.

Prof. Dra Paola E M Almeida
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Da Faculdade De Ciências Humanas e da Saúde
 PUC-SP