

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**PADRONIZAÇÃO DA ESCALADA VERTICAL PARA AVALIAR MOTIVAÇÃO EM
RATOS**

TAMIRES MARTINS MARCHETTO

Florianópolis

2019

Tamires Martins Marchetto

PADRONIZAÇÃO DA ESCALADA VERTICAL PARA AVALIAR MOTIVAÇÃO EM RATOS

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Tamires
PADRONIZAÇÃO DA ESCALADA VERTICAL PARA AVALIAR
MOTIVAÇÃO EM RATOS / Tamires Martins ; orientador,
Cilene Lino de Oliveira , 2019.
59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Motivação. 3. Comportamento. 4.
Neurobiologia. I. , Cilene Lino de Oliveira. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Tamires Martins Marchetto

Título: Padronização da escalada vertical para avaliar motivação em ratos.

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 03 de dezembro de 2019.

Prof.^a Dr.^a Marení Rocha Farias,
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Cilene Lino de Oliveira,
Orientadora
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.Dr. Leandro José Bertoglio,
Avaliador
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

M.^a Karolina Domingues,
Avaliadora
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe por toda luta, apoio e amor que possibilitaram eu estar onde estou e ser quem sou, te admiro muito. A minha companheira Cristiane por todo apoio, incentivo, cuidado e doses diárias de felicidade. A minha orientadora Cilene pelos ensinamentos como orientadora e professora supervisora, reuniões de longas horas que passaram em segundos, e pelas palavras nas horas de insegurança.

Sou grata aos meus colegas e ex-colegas de laboratório, Karolina, Patrick, Fabiani, Fabíola, Renato, Francielli, Rafael, Nathalia, Marcus, Ana e Juliana, pelas parcerias, auxílios, conversas, bares e amizades. Também aos meus amigos de turma Caroline, Lucas e Pablo, ter compartilhado essa jornada com vocês tornou o caminho mais leve e feliz.

Aos queridos professores que tive até aqui, vocês me inspiram. Aos cursos pré-universitários populares PVC e Integrar por tornar possível meu ingresso em uma universidade pública, gratuita e de qualidade, e principalmente por estimular em mim o pensamento crítico. A Universidade Federal de Santa Catarina, que foi minha primeira escola e novamente me recebeu de braços abertos na graduação, agradeço pelas oportunidades e tenho muito orgulho dessa Instituição!

RESUMO

Déficit de motivação está frequentemente relacionado a sintomas depressivos. Testes comportamentais para avaliar motivação podem ser úteis no estudo de psicopatologias e seus tratamentos. Na pesquisa básica, um paradigma para estimar motivação em experimentos consiste na associação de uma punição ou recompensa a uma tarefa que o sujeito deve realizar. Punições reduzem a frequência do comportamento, enquanto recompensas aumentam. Aqui, o aparato escada vertical, geralmente utilizado para treinamento de força em ratos, foi adaptado para mensurar a motivação de ratos através da escalada quando recompensados com alimentos palatáveis. A hipótese é que o alimento palatável aumentaria a incidência de escalada. Quarenta ratos machos e fêmeas Wistar (90-120 dias de vida) foram alojados em temperatura controlada, ciclo invertido 12/12 h, com acesso livre a água e comida durante todo o período experimental. Todos os ratos foram expostos a alimentos palatáveis em suas caixas antes dos testes comportamentais, que foram aplicados na seguinte ordem: dia 13: campo aberto (TCA); dia 20: preferência alimentar (TPAL); dia 27 a 41: escalada vertical (TEV, pré-teste, teste, retestes 1 e 2). Todos os testes foram gravados para posterior análise usando o software EthoWatcher. No TCA foram contabilizados parâmetros para locomoção. No TPAL verificou-se o tempo gasto pelos ratos nas proximidades dos alimentos. Em cada sessão do TEV foram registrados os parâmetros de exploração da caixa em diferentes locais do aparato (caixa, escada e abrigo). Grupos de fêmeas (n=19) e machos (n=21) foram aleatoriamente divididos nos subgrupos "Espontâneo" e "Reforçado" antes da sessão teste de escala vertical. No TCA, as fêmeas percorreram uma maior distância (4892,75 cm \pm 171,5) que os machos (3624,48 cm \pm 143,7) (p < 0,0001; teste t). E os machos exploraram mais o centro da arena (85,55 s \pm 5,3) do que as fêmeas (60,89 s \pm 5,5) (p < 0,05; teste t). No TPAL, o alimento preferido por um maior número de animais foi ração (n=17), seguido do Bis (n=11), e os menos preferidos foram o Snow Flakes (n=6) e Froot Loops (n=6). No pré-teste do TEV, a maioria das fêmeas escalaram a escada, enquanto poucos machos o fizeram. A repetição do teste fez com que a latência para escalada diminuísse e o número de fêmeas escaladoras aumentasse em ambos grupos ("Espontâneas", pré-teste: 158,6 s \pm 29,5 (8 escaladoras), reteste 2: 52,72 s \pm 16,62 (9 escaladoras); "Reforçadas" (pré-teste: 218,8 s \pm 63,9 (3 escaladoras), reteste 2: 35,81 s \pm 13,74 (8 escaladoras)). Reforço com alimentos palatáveis não teve influência sobre a motivação para escalada em machos e fêmeas, a repetição do teste se mostrou importante para o aprendizado da tarefa nas fêmeas, mas não dos machos. As ratas mostraram uma maior motivação natural para escalada que os ratos.

Palavras-chave: Alimento palatável. Comportamento. Esforço. Recompensa.

ABSTRACT

Motivation deficits may occur in different psychiatric disorders. Behavioural tests to measure motivation in laboratory might be useful to study psychopathologies and their treatments. In basic research, paradigms to estimate motivation often consist of the association of a punishment or a reward stimulus to a task that a subject has to accomplish. Punishments often reduce the frequency of the actions taken by the subjects while rewards increase them. Here, a vertical climbing task, often used to rodent resistance training, was adapted to measure the motivation of rats to climb a ladder when rewarded with palatable food. The hypothesis is that palatable food would increase the incidence of climbing. Forty male and female Wistar rats (90-120 days of life) were housed under controlled temperature, reversed light-dark cycle 12/12h and free access of water and food during all experimental period. Before behavioural testing, rats were exposed to palatable food in their home cage. Tests were applied in the following order: day 13: open field (TCA); day 20: food preference (TPAL); day 27 to 41: vertical climbing (TEV, pre test, test, retest 1 and 2). All tests were videotaped to further analysis using the software Ethowatcher. In the TCA, parameters of ambulation were scored. In the TPAL, time spent close to palatable food was registered. In each session of TEV were registered parameters of exploration in different sectors of the apparatus (box, ladder and shelter). Before the test session of TEV, female (n=19) and male rats (n=21) were randomly assigned to the subgroups "Spontaneous" and "Reinforced". In the TCA, females traveled largest distances ($4892.75 \text{ cm} \pm 171.5$) than males ($3624.48 \text{ cm} \pm 143.7$) ($p < 0.0001$; t test) but males explored longer the center of the arena ($85.55 \text{ s} \pm 5.3$) than females ($60.89 \text{ s} \pm 5.5$) ($p < 0.05$; teste t). In the TPAL, the preferred food to a high number of animals was the chow (n=17), followed by chocolate (n=11), and then Snow Flakes (n=6) and Froot Loops (n=6). In the pretest of TEV, most females climbed the ladder while few males did it. Over repetition of TEV, latency to climb the ladder decreased and the number of female climbers increased in both groups ("Spontaneous", pre test: $158.6 \text{ s} \pm 29.5$ (8 climbers), retest 2: $52.72 \text{ s} \pm 16.62$ (9 climbers); "Reinforced", pre test: $218.8 \text{ s} \pm 63.9$ (3 climbers), retest 2: $35.81 \text{ s} \pm 13.74$ (8 climbers)). palatable food reinforcement had little influence on climbing motivation for male and female rats. Repetition of test seem to be important to the learning of the task in females but not in males. Female rats showed more natural motivation to climbing than males.

Keywords: Behavior. Effort. Hedonic Food. Reward.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via mesocorticolímbica	12
Figura 2- Efeitos dos reforços e punições sobre o comportamento animal.....	13
Figura 3 - Rato Wistar	18
Figura 4 - Cestos metálicos contendo alimentos palatáveis	19
Figura 5 - Arena quadrada do Campo aberto	20
Figura 6 - Divisões do campo aberto.....	21
Figura 7 - Divisões da arena do TPAAL	22
Figura 8 - Aparato de escalada vertical	24
Figura 9 – Catálogo comportamental do experimento piloto	25
Figura 10- Catálogo comportamental do Experimento 1	26
Figura 11 – Desenho experimental do experimento 1	28
Figura 12- Frequência de escalada por sessão de treinamento	32
Figura 13- Frequência da escalada antes e depois do treinamento.....	33
Figura 14- Mudança da frequência total dos comportamentos de acordo com a cor de luz	33
Figura 15- Diferença sexual na exploração do centro da arena.....	35
Figura 16- Diferença sexual na locomoção no TCA	36
Figura 17- Relação entre locomoção e exploração central.....	36
Figura 18- Exploração do centro da arena na ausência e presença de alimentos nos cantos ...	38
Figura 19- Distância percorrida na arena na ausência e presença de alimentos nos cantos	39
Figura 20- Preferência das fêmeas por alimentos.....	40
Figura 21- Preferência dos machos por alimentos.....	41
Figura 22- Número de animais por alimentos preferidos	42
Figura 23- Comparação entre grupos na sessão de teste	46
Figura 24- Aprendizado com a repetição do teste	47
Figura 25 - Correlação entre latência para escalada e locomoção.....	49
Figura 26 - Correlação entre frequência de escalada e locomoção	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATV Área tegmental ventral

TCA Teste do campo aberto

TEV Teste de escalada vertical

TPAL Teste de preferência alimentar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MOTIVAÇÃO E PSICOPATOLOGIAS	11
1.2	ANATOMIA DA MOTIVAÇÃO	11
1.3	MOTIVAÇÃO E TESTES COMPORTAMENTAIS	12
1.4	LIMITAÇÕES DOS TESTES QUE AVALIAM MOTIVAÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	ANIMAIS	18
3.2	APRESENTAÇÃO DA COMIDA	19
3.3	TESTE DO CAMPO ABERTO	20
4.3.1	Análise TCA	21
3.4	TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR	22
4.4.1	Análise TPAL	22
3.5	ESCALADA VERTICAL	23
4.5.1	Análise TEV	24
3.6	EXPERIMENTO PILOTO	26
3.7	EXPERIMENTO 1	27
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO PILOTO	31
4.1.1	Piloto – tempo não segmentado	31
4.1.2	Piloto - dados segmentados minuto-a-minuto.	34
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1	34
4.2.1	Apresentação da comida	34
4.2.2	Teste do campo aberto	35
4.2.3	Comparação entre teste do campo aberto e teste de preferência alimentar	37
4.2.4	Teste de Preferência alimentar	39
4.2.5	Teste de Escalada Vertical	42
4.2.6	Perfil dos animais experimentais	48
5	CONCLUSÃO	50

REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE A – Histórico dos animais	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO E PSICOPATOLOGIAS

A motivação pode ser definida como um processo que possibilita o ajuste do ambiente interno e externo em resposta a um estímulo, sendo fundamental para a sobrevivência de um organismo (SALAMONE et al., 2016). Anedonia e avolição são categorias de déficit de motivação presentes na depressão do humor. A anedonia é a redução no sentimento de prazer em tarefas que eram prazerosas anteriormente, enquanto que a avolição seria uma redução de atividades direcionadas a um objetivo (DOWD et al., 2016), estando relacionadas a sintomas como apatia. A falta de motivação pode ser expressa em diversas psicopatologias, como depressão, bipolaridade e esquizofrenia (BAILEY et al., 2015; PIZZAGALLI et al., 2008; SALAMONE et al., 2006) doenças que afetam grande parte da população. Somente a depressão acomete aproximadamente 4,4% da população mundial e 5,8% dos brasileiros (WHO, 2017), majoritariamente mulheres.

Atualmente os tratamentos farmacológicos mais comuns dos sintomas da depressão tem como base a teoria das monoaminas, que indicam a causa da depressão como um déficit nas transmissões monoaminérgicas (serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica), e os fármacos antidepressivos, com seus diferentes mecanismos de ação aumentam a concentração dessas monoaminas nas fendas sinápticas, otimizando essas transmissões (SCHILDKRAUT; KETY, 1967).

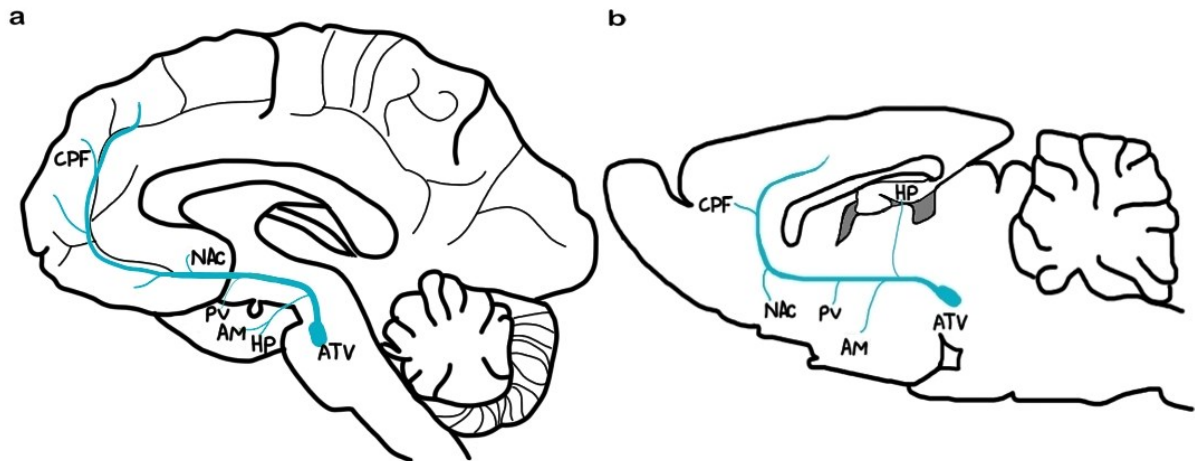
1.2 ANATOMIA DA MOTIVAÇÃO

A regulação da motivação parece ter fundamentalmente o envolvimento do componente dopaminérgico (SALAMONE et al., 2015). Desde 1950 é conhecido que a dopamina está presente no processo de recompensa, e seus níveis afetam diretamente o esforço direcionado a ela (BERRIDGE; ROBINSON, 1998). Além de regular as respostas comportamentais de estímulos hedônicos, esses neurônios dopaminérgicos também estão envolvidos na resposta a estímulos aversivos e estressantes (ABERCROMBIE et al., 1989).

O comportamento motivado é gerado a partir da atividade de regiões conectadas entre si, onde é avaliada a importância de um estímulo e atribui-se um valor a ele. A partir da avaliação do estímulo, um comportamento compatível é selecionado pelo organismo. O circuito motivacional tem como base as projeções da área tegmental ventral (ATV) para as regiões

corticais e límbicas, chamada via mesocorticolímbica (Figura 1). As principais regiões que recebem as projeções dopaminérgicas da ATV e compõem essa via são o núcleo accumbens, hipocampo, amígdala, pálido ventral e córtex pré-frontal (LOVE, 2015).

Figura 1 - Via mesocorticolímbica



Legenda: Representação do encéfalo humano (a) e rato (b) em corte sagital. Neurônios dopaminérgicos da via mesocorticolímbica representados em azul. CPF córtex pré-frontal; NAc núcleo accumbens; PV pálido ventral; AM amígdala; HP hipocampo e ATV área tegmental ventral. Fonte: Elaborado pela autora.

A porção medial do córtex frontal parece estar relacionada ao valor da recompensa, enquanto o córtex cingulado anterior é responsável por associar a ação e a recompensa (RUSHWORTH et al., 2011). A amígdala, além de processar informações sensoriais, responde a pistas de uma futura recompensa e calcula sua magnitude (BELOVA; PATON; SALZMAN, 2008). O hipocampo é responsável por processar informação contextual na memória e transmiti-la através das conexões com a ATV e o núcleo accumbens, relacionando contexto e recompensa. O núcleo accumbens é visto como um centro de integração com as outras áreas, onde as informações do córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala são assimiladas para, por meio de conexões com o pálido ventral e mesencéfalo, se transformarem em ação (LUO et al., 2011).

1.3 MOTIVAÇÃO E TESTES COMPORTAMENTAIS

Na ciência básica, para entender melhor as psicopatologias, sintomas expressos, e desenvolvimento de novas opções terapêuticas psicofarmacológicas são realizados testes comportamentais em animais como ratos, camundongos e mosca-das-frutas (JONES et al.,

2011). O uso desses animais como ferramentas para o desenvolvimento de novos testes comportamentais, junto ao refinamento dos já existentes, contribuem para uma melhor avaliação dos sintomas relacionados às alterações psicopatológicas (NUNES; HALLAK, 2014).

A função hedônica em animais de laboratório pode ser avaliada usando o teste de preferência por sacarose. Neste teste é fornecido ao roedor um recipiente com água e outro com solução de sacarose, verificando a proporção ingerida, o maior consumo de solução sacarose indica uma resposta hedônica (MUSCAT; WILLNER, 1989), que parece estar relacionando tanto a palatabilidade da solução quanto do benefício calórico (BOLLES; HAYWARD; CRANDALL, 1981), capaz de estimular a via de recompensa. Os alimentos que possuem essas características serão mencionados aqui como “alimentos palatáveis”. Em outro teste, avalia-se a reatividade a estímulos gustativos (teste de reatividade ao sabor), através das expressões faciais observadas. Reação de “*liking*”, definida como séries rítmicas de protruções de língua, observada em várias espécies como humanos, chimpanzés, ratos e camundongos, indica uma preservação da função hedônica (BERRIDGE; ROBINSON, 2003). Para avaliar a avolição, os testes envolvem aplicação de reforços ou punições, dependendo da intenção do experimentador com a modulação do comportamento do sujeito, aumentando ou diminuindo sua frequência (Figura 2).

Figura 2- Efeitos dos reforços e punições sobre o comportamento animal



Reforços são estímulos que quando apresentados após uma ação aumentam a incidência dela no futuro, enquanto punições são estímulos que diminuem esta incidência. Reforços e punições podem ser dos tipos positivos ou negativos, ou seja, respectivamente presentes ou suprimidos de uma situação específica (NALL; RUNG; SHAHAN, 2019; SALAMONE et al., 2006).

Os reforços positivos ou recompensas, geralmente alimentos (pellet de açúcar ou água e ração após privação), são disponibilizados aos animais experimentais ao final de tarefas específicas como pressionar uma alavanca, por exemplo. Nestes testes, a quantidade de vezes que o rato precisa realizar a tarefa para conseguir a recompensa pode permanecer fixa (fixed ratio) ou aumentar ao decorrer da sessão (progressive ratio). Neste paradigma, o momento que o rato deixa de realizar a tarefa (pressionar a alavanca) é chamado de “*breakpoint*” e é considerado proporcional ao estado motivado do animal. No trabalho de Tapia et al. (2019), as fêmeas apresentaram um maior “*breakpoint*” e consumo de pellet de açúcar que os machos no progressive ratio. Na utilização do pellet de açúcar (alimento palatável) como reforçador, mesmo quando o roedor está em estado saciado, ele se esforça mais para realizar a tarefa, evidenciando que a palatabilidade eleva o valor do reforço, modificando o estado motivacional (HODOS, 1961; MOSCARELLO; BEN-SHAHAR; ETTENBERG, 2009). Estudos em humanos envolvendo recompensa apresentaram resultados parecidos, os sujeitos faziam um esforço maior para as recompensas preferidas (PENROD; WALLACE; DYER, 2008).

O teste de escolha baseada em esforço surgiu para superar algumas limitações do progressive ratio, também é realizado na caixa de Skinner, uma caixa fechada possuindo uma alavanca a qual o animal é treinado a pressionar para obter água ou comida através de um local dispensador presente na caixa, e adiciona o componente de custo-benefício (DER-AVAKIAN et al., 2015). Nele, o animal deve decidir entre conquistar um alimento preferido (ou mais abundante) realizando uma tarefa difícil ou obter um alimento menos preferido (ou menos abundante) realizando uma tarefa fácil (SALAMONE et al., 2007). Assim, neste paradigma se evidencia que é “pesada” a relação custo-benefício para a tomada de decisão em realizar a tarefa. Um teste semelhante a esse feito na caixa de Skinner foi realizado por Salamone, Cousins e Bucher (1994) num T-maze ou labirinto em T. Como o nome sugere o aparato possui um formato em T, e o animal era colocado na base que dá acesso ao corredor com os dois braços, em um dos braços possuía um alimento regular, enquanto um alimento preferido (ou abundante) é colocado em outro braço com uma barreira que deveria ser ultrapassada para o acesso. Conforme as sessões se repetiam, a dificuldade de acesso ao alimento preferido aumentava. O

“*breakpoint*” era determinado pelo momento em que o sujeito escolhia o braço com o alimento menos preferido ou em menor quantidade.

1.4 LIMITAÇÕES DOS TESTES QUE AVALIAM MOTIVAÇÃO

Os testes como “*fixed ratio*”, “*progressive ratio*” ou testes de escolha baseado em esforço podem avaliar o grau de motivação em ratos, porém apresentam algumas limitações. Dentre elas pode-se citar a necessidade de equipamentos especiais (e.g. caixa de Skinner), esquemas de treinamento longos, a complexidade experimental e a aplicação de punições ou privações (de água ou de alimentos) que, além de diminuir o bem-estar dos animais, podem levar a conclusões equivocadas (MOSCARELLO; BEN-SHAHAR; ETTENBERG, 2009). Por exemplo, o valor de uma recompensa pode diminuir à medida que o sujeito alcança a saciedade ou também devido à intolerância do sujeito sobre as alterações no intervalo entre uma apresentação da recompensa e a outra (DER-AVAKIAN et al., 2016).

Por outro lado, o aumento da resposta (apertar a alavanca) pode acontecer devido a um automatismo motor e excitação geral não dirigida a tarefa (BAILEY et al., 2015), exatamente por exigir dos animais um conjunto de movimentos simples. Além de depender do aprendizado do animal em realizar a tarefa, já que a ação em si é um comportamento desconhecido a eles. Com isso, o desenvolvimento de novos métodos que excluem esses vieses é fundamental para uma melhor compreensão da neurobiologia da motivação (WARD, 2015).

O presente trabalho visa desenvolver um novo método para avaliar motivação, com a tentativa de excluir algumas das limitações apresentadas pelos testes já existentes. Assim, buscou-se um esquema experimental que fosse simples de realizar, demandasse pouco tempo experimental, exigisse pouco treinamento e preservasse o bem-estar do animal experimental. A tarefa proposta ao animal é a escalada de uma escada que seria reforçada pela oferta de um alimento palatável. A escalada foi escolhida por se tratar de atividade natural para os ratos (MAKOWSKA; WEARY, 2016) e exige a movimentação coordenada dos membros. Desta maneira, diminui a dificuldade no aprendizado da tarefa e a probabilidade da realização da mesma pela simples agitação do animal ou um automatismo motor. Com uma maior facilidade no aprendizado da escalada, espera-se que o experimento seja mais simples de realizar e mais curto. Apesar de ser um aparato simples, a escada é um objeto versátil que permite alterar o grau de dificuldade para se alcançar uma recompensa, seja alterando a distância entre a base e o topo, seja alterando o ângulo da inclinação.

O bem-estar dos animais experimentais será preservado já que no protocolo não há nenhum momento de privação de alimento visto que a recompensa será um alimento palatável, então mesmo saciado, o animal ainda buscará completar a tarefa (HODOS, 1961). Outro diferencial do trabalho, é a utilização de grupos experimentais composto por fêmeas, levando em consideração as diferenças sexuais, como no comportamento de escalada (HUCK; PRICE, 1976). Esta conduta científica vem sendo exigida por agências financiadoras, como National Institutes of Health (NIH) (COLLINS; TABAK, 2014), uma vez que algumas psicopatologias, como a depressão são mais frequentemente diagnosticadas em mulheres. A existência de um novo método refinado para avaliar a motivação em ratos permitirá um maior entendimento sobre os sintomas expressos nas psicopatologias, além de possibilitar a utilização em testes pré-clínicos *in vivo*, colaborando assim com a descoberta de novas terapias psicofarmacológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um novo teste para avaliar a motivação de ratos através de uma tarefa de esforço.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Adaptar o aparato escada vertical para análise comportamental de ratos.
- b) Criar um catálogo comportamental para a análise do teste.
- c) Aperfeiçoar o teste através de modificações físicas e outras condições experimentais.
- d) Determinar por qual comida (pellet de ração, Froot Loops®, Snow Flakes® e Bis®) os animais tem preferência.
- e) Avaliar se o alimento palatável é um incentivo para motivar a escalada dos animais.
- f) Verificar se há motivação dos ratos para completar a tarefa no aparato.
- g) Observar se há diferenças comportamentais nos testes de acordo com o sexo do animal, fêmea ou macho.
- h) Analisar a relação entre locomoção e realização da tarefa, supondo-se que existem perfis de animais ativos e não ativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Realizou-se o experimento com Ratos Wistar (Figura 3), considerados dóceis e de fácil manipulação. Foram utilizados no Experimento piloto um total de 10 animais (machos), e no Experimento 1, 20 machos e 20 fêmeas, recebidos no biotério (BIO066) com 21 dias de vida e acondicionados em cada biotério de acordo com o sexo. As salas dos animais foram mantidas em temperatura (21 ± 3 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 19 h) controladas. Após aclimatização (aproximadamente 1 semana), os animais eram divididos em 3 a 4 animais por caixa (Experimento piloto) ou em pares por caixas (Experimento 1). As higienizações das caixas foram realizadas três vezes por semana (segunda, quarta e sexta), junto à troca de água e reposição de ração. Os animais tinham acesso livre à água e comida durante todo o período de acondicionamento e experimento. Com 150 dias de vida (Experimento piloto) e de 90 a 120 dias de vidas (Experimento 1), os animais entraram na rotina experimental.

Figura 3 - Rato Wistar



Fonte: SDCFMUSP.

Após o fim do experimento, os animais foram eutanasiados com uma overdose dos anestésicos veterinários cetamina 10% (Syntec, Hortolândia/SP) e xilazina 2% (Syntec, Hortolândia/SP) nas doses de 100mg/Kg e 6mg/Kg respectivamente, através da administração intraperitoneal. Para verificar a profundidade da anestesia foram verificados os reflexos interdigitais com pinçamento doloroso, e reflexo palpebral ao encostar a cauda do animal nos olhos do mesmo (CONCEA, 2016b). Após a perda de reflexo do animal, fez-se a decapitação por guilhotina. Protocolo aprovado pelo comitê de ética CEUA/UFSC (protocolo N° 8080160217).

3.2 APRESENTAÇÃO DA COMIDA

Todos os ratos foram apresentados na caixa de moradia aos alimentos palatáveis de diferentes sabores (chocolate, frutas e milho açucarado) para que tivessem a oportunidade de conhecê-los antes de fazer o teste de preferência alimentar. Assim, pretende-se excluir a possibilidade que o animal evite a comida por ser desconhecida (neofobia) ou se aproxime dela apenas para explorar (neofilia).

Neste procedimento, a apresentação da comida foi feita com 2 cestos fechados (em forma de cubo feitos de grade metálica revestida com plástico, nas dimensões de 5 cm x 5 cm x 5 cm com 4 espaços de 5 mm x 5 mm em cada face) contendo em cada, uma unidade de cada alimento palatável (Figura 4), descritos a seguir com respectivas marcas e média aritmética das massas medidas das unidades ($n=20$) \pm desvio padrão: Froot Loops (Kellogg's) $0,275\text{g} \pm 0,04$; Snow flakes (Nestlé) $0,146\text{g} \pm 0,03$; e Bis preto (Lacta) $1,5\text{g} \pm 0,21$ - considerar uma unidade igual $\frac{1}{4}$ de um Bis inteiro-; colocados nas caixas de moradia contendo água e ração como usualmente.

Figura 4 - Cestos metálicos contendo alimentos palatáveis



Fonte: Elabora pela autora.

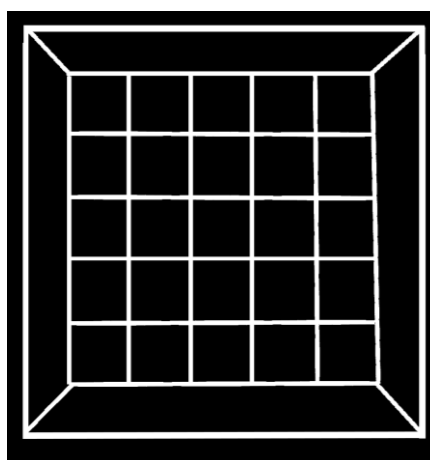
Esses alimentos ficaram expostos aos animais residentes durante 24 horas, era feita a conferência dos cestos (aberto ou fechado) e alimentos (presença ou não) e anotados. Caso o alimento estivesse ausente, eram repostos por mais 24 horas, e repetiu-se esse procedimento totalizando 4 dias consecutivos. Também se observou a aparência das fezes dos animais, e feita anotação caso alteração fosse evidenciada fisicamente.

3.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto (TCA) consiste em uma arena onde o animal é colocado e deixado explorar durante determinado tempo, foi desenvolvido em 1934 por Calvin Hall para avaliação de emocionalidade, e continua sendo utilizado para avaliar locomoção e outros comportamentos exploratórios ou de autolimpeza (PATTI et al., 2005). A diminuição na exploração central da arena é interpretada com um comportamento do “tipo ansioso”, uma vez que a região central é considerada aversiva e drogas ansiolíticas tem apresentado um aumento na locomoção e exploração dessa região (LISTER, 1990). A locomoção pode ser avaliada pela distância total percorrida pelo sujeito em qualquer local da arena.

Neste trabalho, a análise da locomoção dos animais foi realizada com uma arena de campo aberto 100 x 100 cm circundado por uma parede de 40 cm de altura no material MDF revestido preto (possibilitando limpeza com álcool 70% p/v após cada animal), dividido digitalmente em 25 quadrados de 20 x 20 cm (Figura 5) modificado de Castanon et al. (1994). O animal era colocado individualmente no quadrado central, e deixado livre para exploração durante 5 minutos de sessão, enquanto a sessão era gravada por uma câmera posicionada próxima ao teto da sala de experimental, dando visibilidade a todo aparato. As análises dos vídeos obtidos foram feitas posteriormente utilizando o software Ethowatcher (CRISPIM JUNIOR et al., 2012). O presente teste foi realizado para verificar se o animal tem preferência por algum canto da arena; sua locomoção total; e perfil de exploração central e periférica; além de familiarizar o animal com a arena para posterior teste de preferência alimentar.

Figura 5 - Arena quadrada do Campo aberto

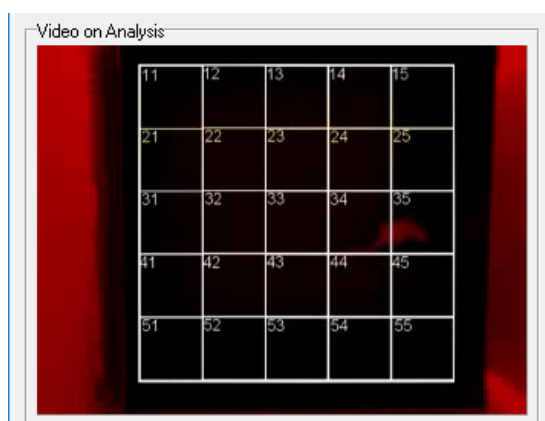


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1 Análise TCA

Nos vídeos do campo aberto foi realizada a sobreposição de uma imagem com as divisões do campo em 25 quadrados numerados com pares de números de acordo com a posição horizontal (linhas de 1 a 5, primeiro número) e vertical (colunas 1 a 5, segundo número) (Figura 6). O quadrado “onde está a maior parte do corpo do sujeito” foi considerado o local onde ele está presente (no exemplo abaixo quadrado 35), gerando os parâmetros de latência, frequência e duração para cada local, e possibilitando a soma dos mesmos para obter dados sobre uma região específica da arena.

Figura 6 - Divisões do campo aberto



Fonte: Elaborado pela autora.

A locomoção foi avaliada a partir do número de quadrantes que o animal cruzou durante o teste e pela distância total percorrida, obtida com a função “*tracking*” do Ethowatcher. Para avaliar o comportamento do “tipo ansioso” no TCA foi realizada a soma da duração em que o animal permaneceu nos quadrados periféricos (11+12+13+14+15+21+25+31+35+41+45+51+52+53+54+55) e centrais (duração total menos a duração nas periferias) da arena. Para verificar se o animal tinha preferência por um dos quatro cantos da arena, e excluí-la no teste de Preferência alimentar, foi feita a soma da duração dos animais em cada canto, superior esquerdo (11+12+21+22), superior direito (14+15+24+25), inferior esquerdo (41+42+51+52) e inferior direito (44+45+54+55).

3.4 TESTE DE PREFERÊNCIA ALIMENTAR

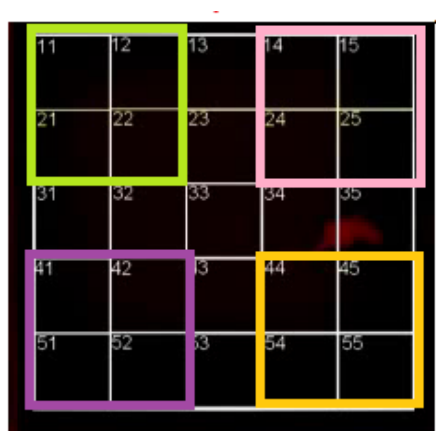
Para avaliar nos animais a preferência por alimento palatável usou-se o “teste de preferência alimentar” (TPAL) feito na arena do Campo aberto. Em cada um dos quatros cantos da arena (superior esquerdo (11+12+21+22), superior direito (14+15+24+25), inferior esquerdo (41+42+51+52) e inferior direito (44+45+54+55)) foram colocadas 5 unidades de cada alimento (Froot Loops (Kellogg's), Bis preto (Lacta), Snow flakes (Nestlé), ração). O local de cada opção de alimento foi arbitrariamente selecionado (primeiro lote de animais do experimento 1) ou sorteados com papéis contendo escrito o nome das opções de alimentos para cada canto (segundo lote de animais do experimento 1).

No início do teste o animal foi colocado no quadrado central da arena e permitido explorar durante os 5 minutos de sessão. Uma câmera posicionada próxima ao teto da sala de experimento, com visibilidade de todo o aparato gravava a sessão para posterior análise.

4.4.1 Análise TPAL

Na análise TPAL, os vídeos tinham as mesmas divisões que as do Campo aberto, (ver item 4.3.1 e Figura 7). Para medir a preferência desses animais pelos alimentos, utilizou-se o percentual da duração (100%= soma do tempo nos 4 cantos) em que o animal permaneceu no quadrado o qual o alimento palatável estava presente e os outros três próximos a esse, totalizando 4 quadrados -que chamaremos aqui de cantos-, destacados na Figura 7.

Figura 7 - Divisões da arena do TPAL



Fonte: Elaborado pela autora.

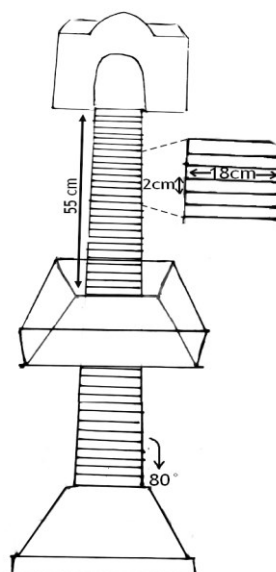
Para excluir uma possível preferência por um canto da arena e não pelo alimento palatável, subtraiu-se do percentual da duração em cada canto da sessão de TPAL do percentual da duração em que o animal permaneceu nesses mesmos cantos na sessão de TCA. Espera-se que os animais permaneçam na sessão de TCA 25% do tempo total dos cantos em cada canto, e que na sessão de TPAL esses percentuais se redistribuam de acordo com a preferência alimentar do animal, diminuindo o percentual de tempo explorando perto de alguns alimentos e aumentando em outros.

3.5 ESCALADA VERTICAL

Para realização do teste de escalada vertical (TEV) foi feita a adaptação de um aparato já existente e utilizado para o treinamento de resistência em roedores (NETO et al., 2016). O aparato é conhecido como “escada vertical”, consiste numa plataforma na base de uma escada de madeira com degraus metálicos (110 cm altura, 18 cm largura, distância de 2 cm entre degraus, com 80° de inclinação) que na parte superior possui um abrigo no formato de uma casa sem teto, também de madeira (Figura 8). A essa estrutura, foi adicionado uma caixa plástica (27,5 cm x 17 cm x 13,5 cm), que tem a possibilidade de ser acoplada em alturas diferentes da escada (baixa: 0 cm; intermediária: 55 cm; alta: 102 cm).

O TEV foi utilizado para avaliar a motivação dos ratos em completar a atividade proposta, i.e. escalada, com diferentes graus de dificuldade. No estudo piloto, os animais foram alocados em 3 diferentes grupos: espontâneo (ausência de influência ou incentivo); forçado (com o experimentador forçando a escalada do animal empurrando delicadamente com as mãos em direção à escada e para cima); reforçado (Froot Loops na plataforma superior do aparato). No experimento 1, os animais foram alocados em 2 diferentes grupos: espontâneo (ausência de influência ou incentivo) e reforçado (mistura de alimentos palatáveis na plataforma superior do aparato).

Figura 8 - Aparato de escalada vertical



Fonte: Elaborado pela autora.

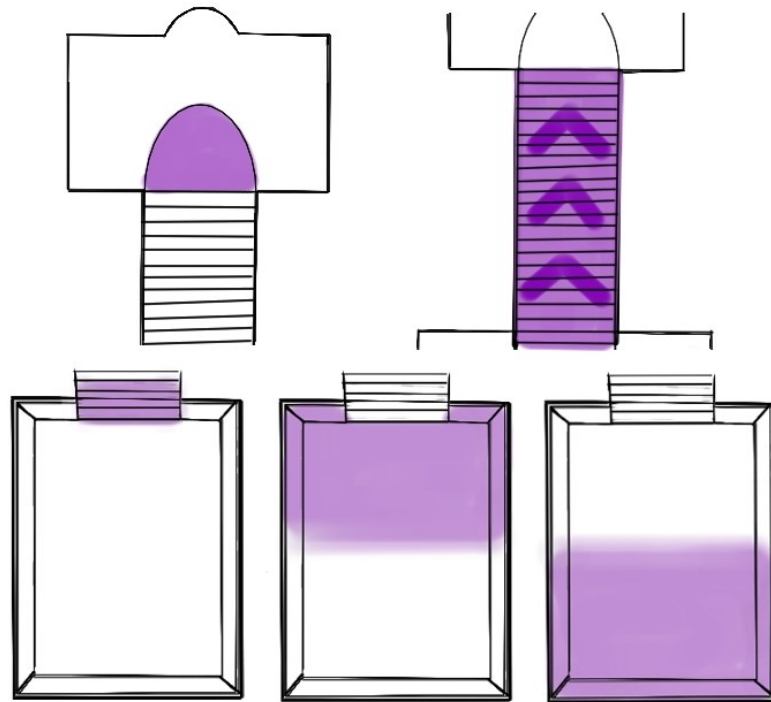
Independente do grupo, os animais eram colocados individualmente na caixa plástica que dá acesso à escada e abrigo, as sessões tinham a duração de 15 ou 5 minutos e eram gravadas por uma câmera posicionada próxima ao teto da sala de experimento, com visibilidade de todo o aparato.

4.5.1 Análise TEV

A análise do comportamento no TEV foi feita com base dos possíveis locais em que o animal pode explorar: caixa base, escada e abrigo. Primeiramente foi realizada uma análise qualitativa para verificar o comportamento dos animais frente a diferentes situações, e também para identificar a melhor forma de fazer a análise quantitativa, auxiliando no aperfeiçoamento do catálogo proposto inicialmente.

No Experimento Piloto o catálogo possuía 5 categorias (Figura 9), separadas de acordo com a proximidade do animal do abrigo acima da escada, na plataforma superior. Nomeadas como: Parte distal da caixa (distal), parte proximal da caixa (proximal), tocando a escada (tocando), escalando a escada (escalando) e entrando no abrigo (abrigo). E para essas categorias obtivemos os parâmetros de frequência, duração e latência. Também foi observado o perfil comportamental ao decorrer da sessão, através da segmentação do tempo de sessão em 0-60s; >60-120s; >120-180s; >180-240s; >240s-300s.

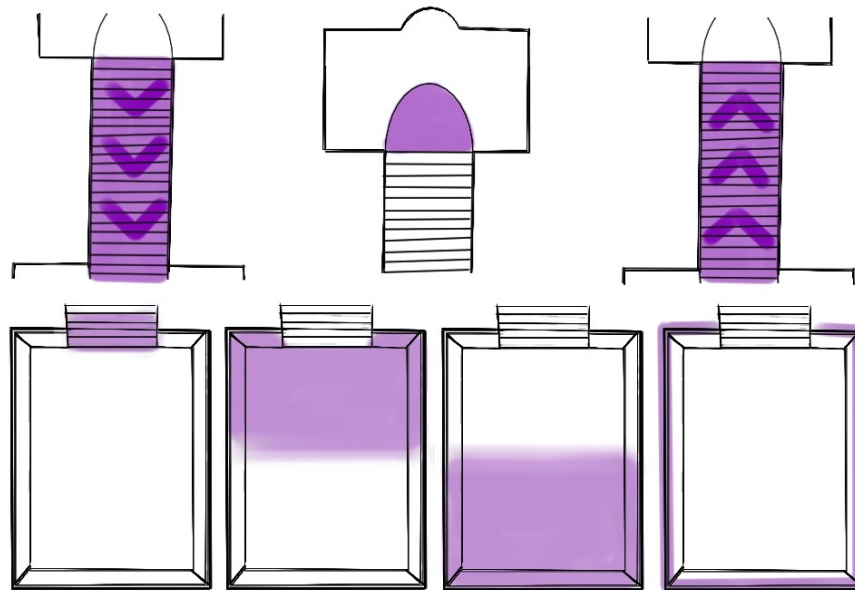
Figura 9 – Catálogo comportamental do experimento piloto



Legenda: Abrigo e escada vistos de frente, categorias: abrigo e escalada. Caixa base vista de cima com parte da escada; Da esquerda para direita, categorias: tocando, proximal e distal. Fonte: Elaborado pela autora.

No Experimento 1, sentiu-se a necessidade de detalhar o catálogo experimental, por razão do teste ter sido realizado também com fêmeas e essas apresentarem comportamentos não observados anteriormente nos machos, e outros comportamentos já realizados pelos machos no Experimento Piloto não estavam presentes no catálogo. O catálogo comportamental utilizado no Experimento 1 (Figura 10) foi dividido nas seguintes categorias: Parte distal da caixa (distal), parte proximal da caixa (proximal), presente na borda da caixa (borda), tocando a escada (tocando escada), escalando a escada (escalada), entrando no abrigo (abrigo), e descendo a escada (descendo).

Figura 10- Catálogo comportamental do Experimento 1



Legenda: Abrigo e escada vistos de frente, categorias: descendo, abrigo e escalada. Caixa base vista de cima com parte da escada; Da esquerda para direita, categorias: tocando, proximal, distal e borda. Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 EXPERIMENTO PILOTO

Esse experimento foi dividido em três semanas, para facilitar o entendimento de seu desenvolvimento foi elaborada a Quadro 1 contendo todas as informações dos aspectos de cada sessão experimental de TEV. As sessões ocorreram com intervalos de no mínimo um dia entre elas. As sessões da primeira semana foram consideradas de ambientação para todos os ratos. Nas sessões de ambientação, cada rato era colocado individualmente na caixa base, localizada no chão em frente à escada, para livre exploração.

Quadro 1 – Desenho experimental do experimento piloto.

Continua

	Sessão: Semana- Dia (Dia da semana)	Incentivo do grupo? (Froot Loops/Forçado)	Altura da caixa?	Cor da luz?
Semana 1	Sessão: 1ª: S1-Dia 1 (Segunda-feira)	Não	Baixa	Branca
	Sessão: 2ª: S1-Dia 2 (Quinta-feira)	Não	Baixa	Branca

**Quadro 2 – Desenho experimental do experimento piloto.
Conclusão**

	Sessão: Semana- Dia (Dia da semana)	Incentivo do grupo? (Froot Loops/Forçado)	Altura da caixa?	Cor da luz?
Semana 2	Sessão: 3 ^a : S2-Dia 1 (Segunda-feira)	Sim	Alta	Branca
	Sessão: 4 ^a : S2-Dia 2 (Quarta-feira)	Sim	Intermediária	Branca
	Sessão: 5 ^a : S2-Dia 3 (Sexta-feira)	Sim	Intermediária	Vermelha
Semana 3	Sessão: 6 ^a : S3-Dia 1 (Segunda-feira)	Sim	Baixa	Vermelha
	Sessão: 7 ^a : S3-Dia 2 (Quarta-feira)	Não	Baixa	Vermelha

Legenda: Elaborado pela autora

Na segunda semana, os ratos foram alocados arbitrariamente a diferentes grupos experimentais que eram caracterizados pela disponibilidade ou ausência de algum tipo de incentivo para escalar a escada. Os ratos de cada grupo experimental foram expostos ao aparato da 3^a à 6^a sessão, denominada sessões de treinamento. A altura da caixa base foi modificada em cada sessão de forma a aumentar a dificuldade ao longo do treinamento. Assim, na 3^a sessão a caixa base esteve na altura alta (facilitando o acesso do animal ao abrigo na plataforma superior), na 4^a sessão a caixa esteve na altura intermediária, na 5^a sessão a caixa base se manteve na mesma altura, porém passou a ser utilizada a luz vermelha. Na terceira semana, foi realizada a 6^a sessão, com a caixa base em altura baixa. E na 7^a sessão, denominada teste, a caixa base esteve em altura baixa e a todos os ratos foi permitida exploração livre do aparato sem nenhum tipo de incentivo.

3.7 EXPERIMENTO 1

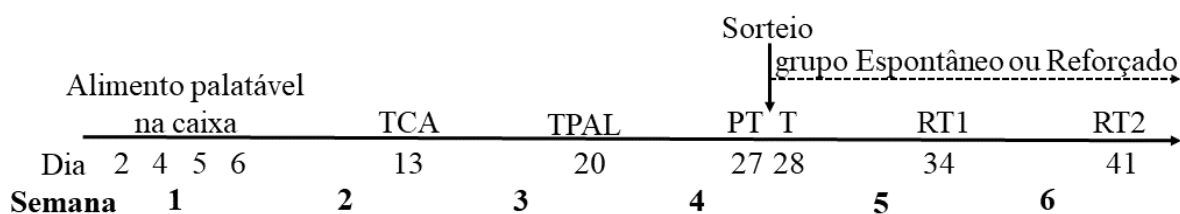
De acordo com os dados obtidos durante o estudo piloto (ver item 5.1), a presença de incentivo, como alimento palatável no abrigo ou caixa próxima ao abrigo durante o TEV, e repetição do TEV (treinamento) facilita a escalada da escada. No experimento 1 se investigou a influência do alimento palatável sobre a realização espontânea ou no aprendizado da escalada.

Também se investigou o comportamento das ratas em comparação ao dos ratos. O desfecho de interesse primário foi a frequência de escalada, porém foram também registradas as demais ações dos animais na situação para posterior avaliação. Para tanto, os seguintes grupos experimentais foram idealizados:

- 1) Machos não incentivados a escalar com alimentos palatáveis (grupo Espontâneo);
- 2) Machos incentivados a escalar com alimentos palatáveis (grupo Reforçado);
- 3) Fêmeas não incentivadas a escalar com alimentos palatáveis (grupo Espontâneo);
- 4) Fêmeas incentivadas a escalar com alimentos palatáveis (grupo Reforçado).

Antes do experimento, os ratos machos e fêmeas eram mantidos em caixas com grupos de seis ratos separados por sexo desde o desmame até alcançarem entre 42 a 56 dias de vida quando foram separados em pares. Em cada caixa havia um rato com marcação de caneta hidrossolúvel na cauda e o outro sem esta marca. As marcas da cauda foram usadas para identificar os animais ao longo do experimento. Quando os animais alcançaram entre 90 a 120 dias de vida entraram na rotina experimental (Figura 11). As condições de alojamento e biotério foram as mesmas descritas para o estudo piloto. A alocação dos animais para os grupos experimentais foi feita por sorteio com uma moeda imediatamente antes da primeira sessão de treinamento (também denominada de teste). Todos os testes desse experimento foram realizados entre as 9 e 13h.

Figura 11 – Desenho experimental do experimento 1



Legenda: TCA= teste do campo aberto; TPAL= teste da preferência alimentar; Escalada vertical: PT= pré-teste, T= teste, RT1= reteste 1 e RT2= reteste 2. Fonte: Elaborado pela autora.

Antes de iniciar o TEV se verificou o interesse dos animais por alimentos supostamente palatáveis, com um TPAL, para que pudessem ser usados como incentivos para a escalada durante o TEV. Para tanto foi examinado o consumo dos “alimentos palatáveis” na gaiola-casa e em um teste de preferência alimentar na 1ª e na 3ª semana experimental, respectivamente. Na 2ª semana, os animais passaram pelo TCA na mesma arena onde também realizou o teste de preferência alimentar, para separar a preferência por um alimento da preferência por um local. Para os testes de escalada a caixa base foi posicionada na altura intermediária por representar

um grau de dificuldade médio para os ratos (ver estudo piloto), e os alimentos consumidos tanto na gaiola-casa como no TPAL, considerado palatável, foram usados como incentivos.

As quatro sessões de escalada ocorreram entre 4^a e 6^a semanas experimentais. A primeira sessão, também denominada pré-teste ocorreu na 4^a semana e consiste de uma longa exposição para a familiarização (15 minutos) contendo alimento palatável no abrigo para todos os grupos, 24 horas depois ocorreu a primeira sessão de 5 minutos de treinamento, também denominada teste, que se repetiu nas 6^a e 7^a semanas. A repetição da 6^a semana foi denominada reteste 1 e a da 7^a semana reteste 2. A denominação pré-teste, teste, reteste 1 e reteste 2 foi adotada para facilitar a comparação com o teste de nado forçado repetido usado em nosso laboratório (MEZADRI et al., 2011; POSSAMAI et al., 2014; DOMINGUES et al., 2018). Os ratos dos grupos Reforçados foram testados no aparato com alimentos palatáveis na plataforma superior nas sessões de teste e retestes, enquanto os alimentos palatáveis foram suprimidos para os ratos dos grupos Espontâneos. Os desfechos analisados foram as frequências de subida da escada no pré-teste, nos testes e retestes. O grau de motivação para a escalada dado pelo alimento palatável em si foi estimado pela análise dos desfechos da sessão de teste entre os grupos. O grau de motivação para escalada dado pelo aprendizado da tarefa foi estimado pela análise da diferença dos desfechos entre as sessões de pré-teste (primeiros 5 min) com o reteste 2.

Nos dias do teste, reteste 1 e reteste 2 de escalada vertical foram medidas a massa corporal dos animais em uma balança de precisão (0,01 gramas, Classe II, Shimadzu). Todos os testes comportamentais foram realizados em uma mesma sala de experimento, com temperatura ambiente de 21 ± 2 °C; luz vermelha (máximo 10 luxes) e no máximo 80 decibéis de ruído (CONCEA, 2016a), verificados todos os dias de experimento.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre dois grupos (ex: machos e fêmeas) no TCA ou no TPAL foi utilizado o Test t com correção de Welch, devido os tamanhos de amostra diferentes. Para comparação do mesmo grupo em diferentes situações foi utilizado o Test t pareado. A relação entre dois parâmetros diferentes foi avaliada a partir do r^2 (regressão linear), e para verificar a correlação entre dados com relação monotônica e não linear usou-se r de Spearman. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas utilizando Análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: sexo; grupo). As comparações intragrupos foram feitas usando ANOVA de duas vias (Fatores: sexo; condição) com medidas repetidas (níveis: TCA; TPAL

ou pré-teste; reteste 2). Em todas as figuras e nos textos a seguir os dados são apresentados com média e erro padrão da média (média \pm EPM). Os valores exatos de tamanho da amostra por grupos estão nas legendas das figuras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro foi realizado o experimento piloto, e a partir da observação de seus dados o Experimento 1 foi desenvolvido. Portanto, essa seção foi organizada da mesma forma, com a discussão dos resultados obtidos no Experimento piloto seguido do Experimento 1.

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO PILOTO

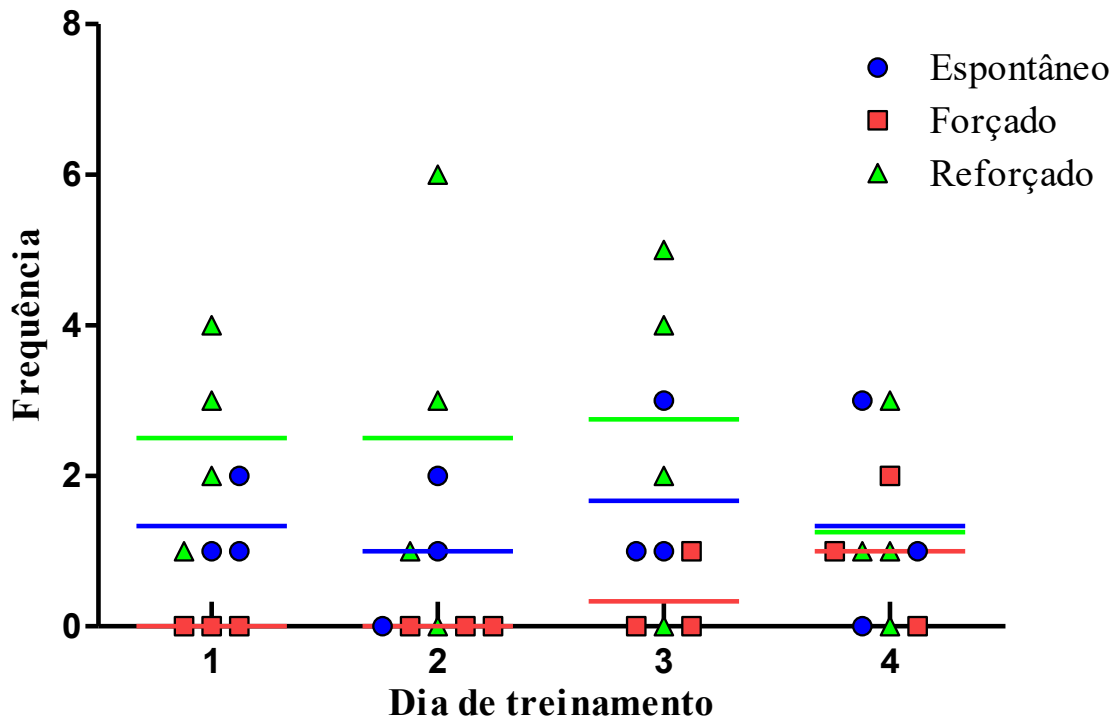
A análise dos resultados do Piloto foi realizada totalizando as medidas dos comportamentos registrados no TEV pela duração total de cada teste ou minuto-a-minuto como descritas nos próximos tópicos.

4.1.1 Piloto – tempo não segmentado

Durante o TEV, os animais de todos os grupos excretaram fezes sólidas e pastosas, principalmente do grupo forçado, que tiveram um número maior de fezes e com aparência diarreica, mostrando um estresse pela situação. Em todas as sessões os animais exploraram mais a caixa base do que a escada ou o abrigo. Ao longo do experimento todos os ratos escalaram a escada pelo menos uma vez, em alguma sessão, mas apenas seis deles alcançaram o abrigo (2 espontâneos, 4 reforçados).

A incidência de escalada variou de acordo com o grupo e a sessão de treinamento do TEV da seguinte maneira: 1- primeiro dia: Reforçado (n=4), Espontâneo (n=3), Forçado (n=0); 2- segundo dia: Reforçado (n=3), Espontâneo (n=2), Forçado (n=0); 3- terceiro dia: Reforçado (n=3), Espontâneo (n=3), Forçado (n=1); 4- quarto dia: Reforçado (n=3), Espontâneo (n=2), Forçado (n=2) (Figura 12).

Figura 12- Frequência de escalada por sessão de treinamento

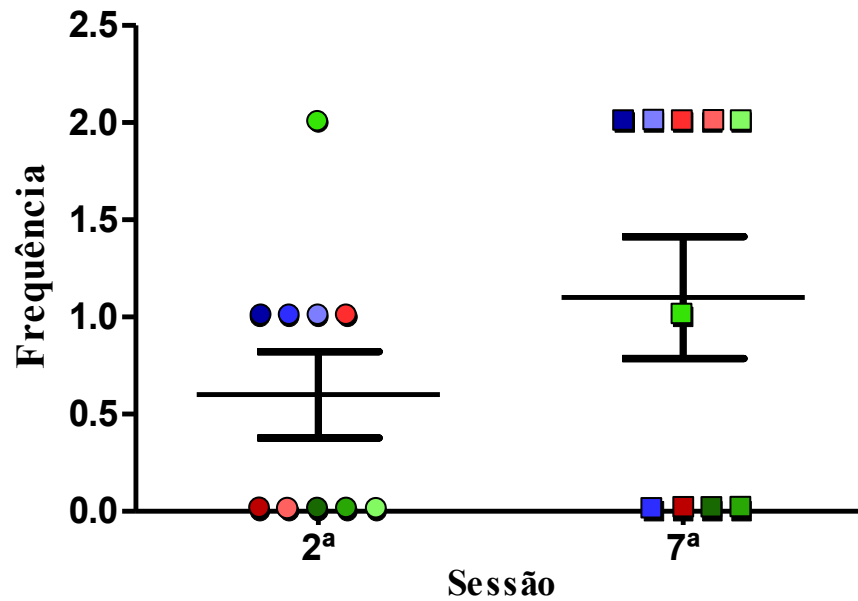


Legenda: Dados expressos em frequência de escalada para cada animal. Símbolo representa cada animal pertencente a determinado grupo e traço colorido representa a média de cada grupo.

Os ratos forçados a subir, demoraram mais sessões de treinamento para começar a escalar quando comparado aos demais grupos. Portanto, ao contrário da expectativa inicial, forçar a subida parece ser uma punição para os ratos uma vez que a frequência de escalada foi menor neste grupo quando comparado aos “Espontâneos”. O grupo de animais reforçados com alimento palatável teve, como esperado, uma maior frequência de escalada. E a caixa na altura intermediária parece ser a mais apropriada para a situação experimental, pois permite a subida dos animais ao mesmo tempo em que mantém a tarefa desafiadora.

Na Figura 13 se mostra a frequência da escalada dos sujeitos na 2ª e 7ª sessão do TEV, antes e depois do treinamento. No total 5 animais aumentaram a frequência de escalada, 3 desses já haviam escalado uma vez na segunda sessão, e 2 nenhuma vez. Dois dos animais diminuíram a frequência de escalada da 2ª para a 7ª sessão. Com isso, o treinamento parece ter colaborado para o aumento do comportamento de escalada para a maior parte dos animais.

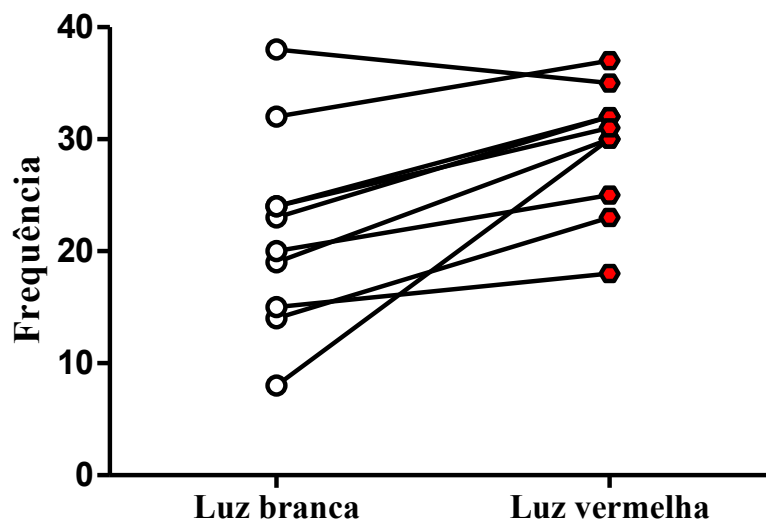
Figura 13- Frequência da escalada antes e depois do treinamento



Legenda: 2ª Sessão referente à antes do treinamento e 7ª sessão referente à depois do treinamento (n=10). Cada cor representa um animal. Azul: Espontâneo, Vermelho: Forçado, Verde: Reforçado.

Com a iluminação da sala com luz na cor vermelha, os animais apresentaram um comportamento mais ativo, evidenciado pelo aumento da frequência total de comportamentos, além de apresentar uma maior homogeneidade nesse parâmetro (Figura 14). Atribui-se o aumento de exploração à baixa aversão causada pela luz vermelha.

Figura 14- Mudança da frequência total dos comportamentos de acordo com a cor de luz



Legenda: Dados expressos como frequência de cada animal (n=10). $p = 0,0046$, test t pareado.

4.1.2 Piloto - dados segmentados minuto-a-minuto.

A segmentação dos dados minuto-a-minuto possibilitou verificar os comportamentos que os animais exibiam no decorrer da sessão. Em todas as sessões, excetuando a segunda de treinamento, os animais foram observados mais vezes na parte Distal e Proximal da caixa nos primeiros 120 segundos de sessão. A partir desse tempo até o final, a exploração da caixa diminuiu e houve aumento da incidência de Escalada e Abrigo, mostrando que há uma tendência de escalada ao longo do tempo da sessão.

Na sessão com a caixa alta, terceira exposição a escada vertical e primeira sessão de treinamento, as frequências de Escalada e Abrigo apareceram mais bem distribuídas pelo tempo de sessão, mas ainda assim se mostraram aumentadas ao final dessa. Esse resultado pode ser devido à facilidade do animal em transitar entre a caixa e abrigo, uma vez que a subida é de 8 cm nessa condição experimental.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO 1

Os resultados do Experimento 1 serão apresentados de acordo com a ordem cronológica de realização dos procedimentos experimentais e testes.

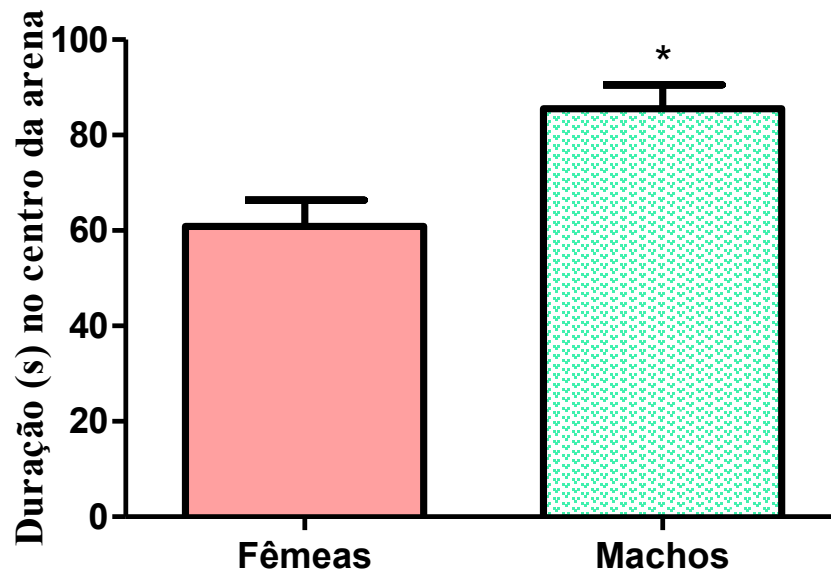
4.2.1 Apresentação da comida

Não foram encontrados resíduos dos alimentos colocados nas caixas de moradia em nenhum dos quatro dias, ou seja, os alimentos palatáveis expostos aos animais foram consumidos todos os dias. Cada caixa possuía dois animais, portanto não há como saber se todos os animais consumiram todos os alimentos palatáveis expostos a eles. E o isolamento dos animais para a realização desse procedimento experimental poderia causar mudanças do comportamento em testes como o campo aberto (MOLINA-HERNANDEZ; TELLEZ-ALCANTARA; PEREZ-GARCIA, 2001). Uma preocupação era a possibilidade de os alimentos palatáveis provocarem uma alteração digestiva nos animais, então se observou as fezes presentes na caixa nesses quatro dias de exposição, e nenhuma alteração foi encontrada.

4.2.2 Teste do campo aberto

No TCA, os machos exploraram mais o centro da arena $85,55 \text{ s} \pm 5,3$ do que as fêmeas $60,89 \text{ s} \pm 5,5$ ($p < 0,05$; teste t), representados na Figura 15, demonstrando nas fêmeas um comportamento mais do “tipo ansioso”. Esse resultado difere dos encontrados na literatura, no trabalho de Scholl et al. (2019) utilizando Sprague-Dawley, tanto as fêmeas em diestro e metaestro quanto em proestro e estro exploraram mais o centro da arena (área total da arena: $54,5 \times 80 \text{ cm}$) que os machos. No trabalho de Burke et al. (2016) tanto as fêmeas da linhagem Sprague–Dawley quanto Wistar-Kyoto passaram um maior tempo no centro da arena (circular, 75 cm de diâmetro) comparadas aos machos. Menor exploração da zona tigmotática (próxima das paredes) também foi observada nas ratas no trabalho de Valle e Gorzalka (1980, linhagem não especificada).

Figura 15- Diferença sexual na exploração do centro da arena

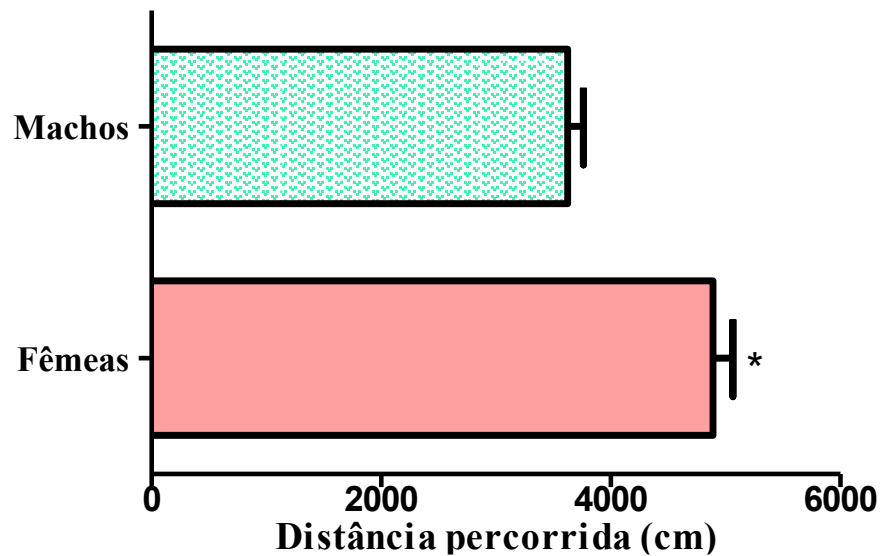


Legenda: Exploração no centro da arena (TCA). Dados expressos em Média ± EPM (Fêmeas n=19, Machos n=21). Teste t com correção de Welch: $p < 0,05$.

Na Figura 16 podemos observar que as fêmeas apresentaram uma locomoção significativamente maior que os machos ($p < 0,0001$; teste t), revelada pela análise da distância total percorrida durante o TCA no aparato como um todo: fêmeas, $4892,75 \text{ cm} \pm 171,5$; machos, $3624,48 \text{ cm} \pm 143,7$. Esses resultados corroboram a literatura para ratos Wistar e outras linhagens (ARCHER, 1975; BURKE et al., 2016; MASUR, 1972; SCHOLL et al., 2019). Durante o TCA, nenhum animal apresentou dificuldades nem limitações locomotoras visíveis

ao explorar a arena, demonstrando integridade física. Apenas um macho (L2-M-CX6-A0) teve a distância percorrida (2239,785 cm) abaixo de dois desvios padrões da média.

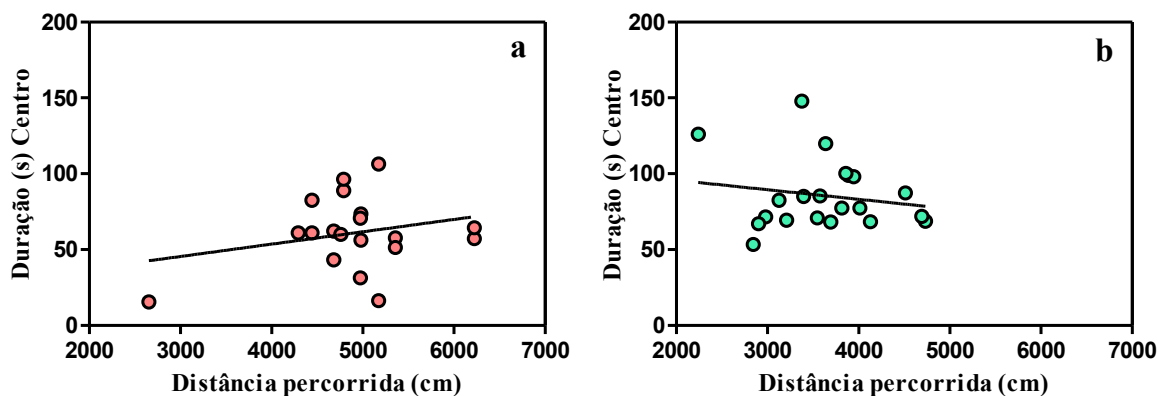
Figura 16- Diferença sexual na locomoção no TCA



Legenda: Distância total percorrida pelos animais no TCA. Dados expressos em Média ± EPM (Fêmeas n=19, Machos n=21). Teste t com correção de Welch: $p < 0,0001$.

Verificou-se também se a exploração central estaria inversamente relacionada a distância total percorrida pelo animal (Figura 17), já que as fêmeas caminham mais e ficam menos no centro da arena e os machos apresentaram um padrão contrário.

Figura 17- Relação entre locomoção e exploração central



Legenda: a) Relação entre a duração no centro da arena e a distância total percorrida pelas fêmeas (n=19; $r^2=0,06530$; $p > 0,05$). b) Relação entre a duração no centro da arena e a distância total percorrida pelos machos (n=21; $r^2=0,02947$; $p > 0,05$).

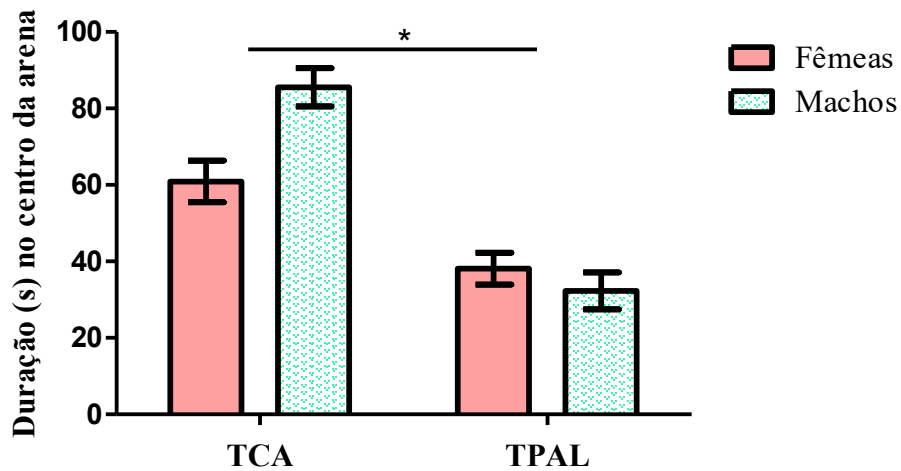
A regressão entre o tempo de duração no centro da arena e a distância total percorrida não apresentam uma correlação significativa tanto para machos ($r^2=0,02947$; $p > 0,05$) quanto fêmeas ($r^2=0,06530$; $p > 0,05$). Esse resultado já havia sido observado no trabalho de Scholl et al. (2019), tanto para os machos quanto para as fêmeas- divididas pelo ciclo estral (diestro+ metaestro e proestro + estro)- não teve relação significativa entre a distância percorrida com a exploração no centro da arena.

4.2.3 Comparação entre teste do campo aberto e teste de preferência alimentar

Para verificar o efeito que a presença dos alimentos nos cantos da arena tinha sobre a exploração da mesma, compararam-se alguns dados do TCA com TPAL, descritos a seguir.

A duração da exploração no centro da arena foi maior no TCA que TPAL (Figura 18) tanto para os machos ($85,55 \text{ s} \pm 5,3$ e $32,27 \text{ s} \pm 5,1$) quanto para as fêmeas ($60,89 \text{ s} \pm 5,5$ e $38,13 \text{ s} \pm 4,2$), enquanto diminuiu a exploração do centro da arena no TPAL aumentou o tempo de exploração nos cantos, de $21,21 \text{ s}$ para fêmeas, e de $50,95 \text{ s}$ para os machos. A presença dos alimentos nos cantos da arena no TPAL teve uma influência significativa sobre a diminuição do tempo de exploração no centro da arena ($F(1,38)=80,95$; $p < 0,0000001$; Partial eta-squared = $0,68$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas), o fator sexo não teve influência significativa sobre a exploração central da arena ($F(1,38)=2,92$; $p = 0,09538$; Partial eta-squared = $0,07$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas), a interação entre os fatores alimentos e sexo foi significativa ($F(1,38)=13,04$; $p = 0,000876$; Partial eta-squared = $0,26$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas)).

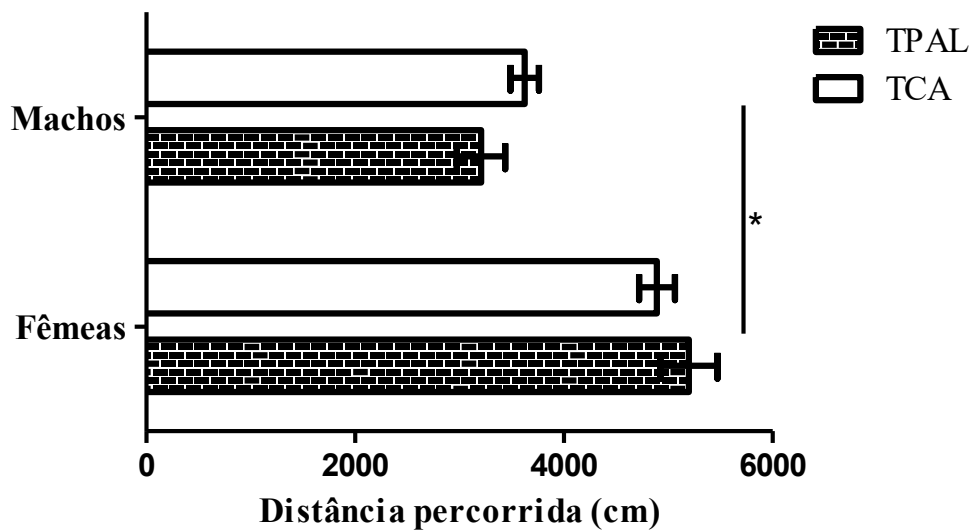
Figura 18- Exploração do centro da arena na ausência e presença de alimentos nos cantos



Legenda: Comparação da exploração central da arena no teste do campo aberto (TCA) e na presença dos alimentos nos cantos da arena (TPAL). Dados expressos em Média \pm EPM (fêmeas n=19, machos n=21). * $p < 0,0000001$ ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

Mesmo diminuindo de $3624,48 \text{ cm} \pm 143,7$ para $3207,203 \text{ cm} \pm 244,1$ (machos) e aumentando de $4892,75 \text{ cm} \pm 171,5$ para $5198,50 \text{ cm} \pm 274,3$ (fêmeas), a presença dos alimentos nos cantos da arena no TPAL não influenciou a distância que os animais andaram na sessão ($F(1,38) = 0,076$; $p = 0,78$; Partial eta-squared = 0,002; ANOVA de duas vias com medidas repetidas)). O sexo do animal teve um efeito significativo tanto para a locomoção no TCA, como visto anteriormente, quanto para a locomoção no TPAL ($F(1,38) = 56,25$; $p = 0,0000001$; Partial eta-squared = 0,5968; ANOVA de duas vias com medidas repetidas)) (Figura 19). A interação entre os fatores sexo e presença do alimento não foi significativa ($F(1,38) = 3,25$; $p = 0,079$; Partial eta-squared = 0,07886; ANOVA de duas vias com medidas repetidas)). É interessante observar também que, na sessão de TPAL os animais apresentaram uma maior variação entre si.

Figura 19- Distância percorrida na arena na ausência e presença de alimentos nos cantos



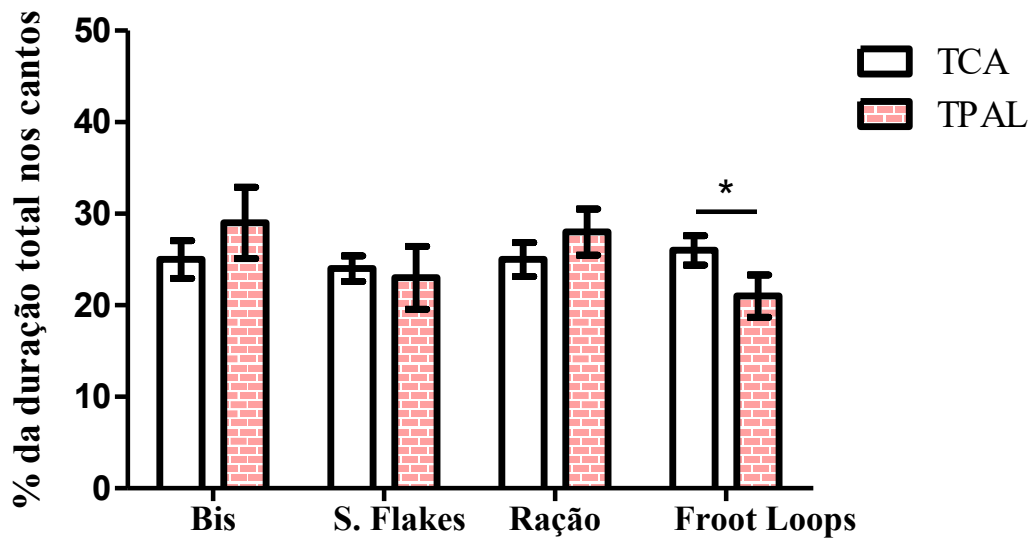
Legenda: Comparação da locomoção total no teste do campo aberto (TCA) e na presença dos alimentos nos cantos da arena (TPAL). Dados expressos em Média \pm EPM (fêmeas $n=19$, machos $n=21$). * $p < 0,0000001$ ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

No APÊNDICE A, é possível observar que, mesmo com as variações individuais nos perfis de exploração da arena, quando comparado o rastreamento da sessão do TCA com do TPAL, há uma tendência de concentração do animal nos cantos, evidenciado pela área marcada e intensidade da cor vermelha.

4.2.4 Teste de Preferência alimentar

As fêmeas apresentaram uma distribuição esperada de duração nos quatro cantos do TCA (Figura 20): a- $25\% \pm 2$ no canto que posteriormente possuirá Bis no TPAL, b- $24\% \pm 1$ no canto que possuirá Snow Flakes, c- $25\% \pm 2$ no da Ração, d- $26\% \pm 2$ no de Froot Loops. Assim, parece que as ratas não tinham uma preferência por nenhum canto na ausência dos alimentos. No TPAL, com a presença de alimentos, o percentual de exploração das ratas se alterou para: a- $29\% \pm 4$ no Bis, b- $23\% \pm 3$ no Snow Flakes, c- $28\% \pm 3$ na ração, d- $21\% \pm 2$ no Froot Loops.

Figura 20- Preferência das fêmeas por alimentos

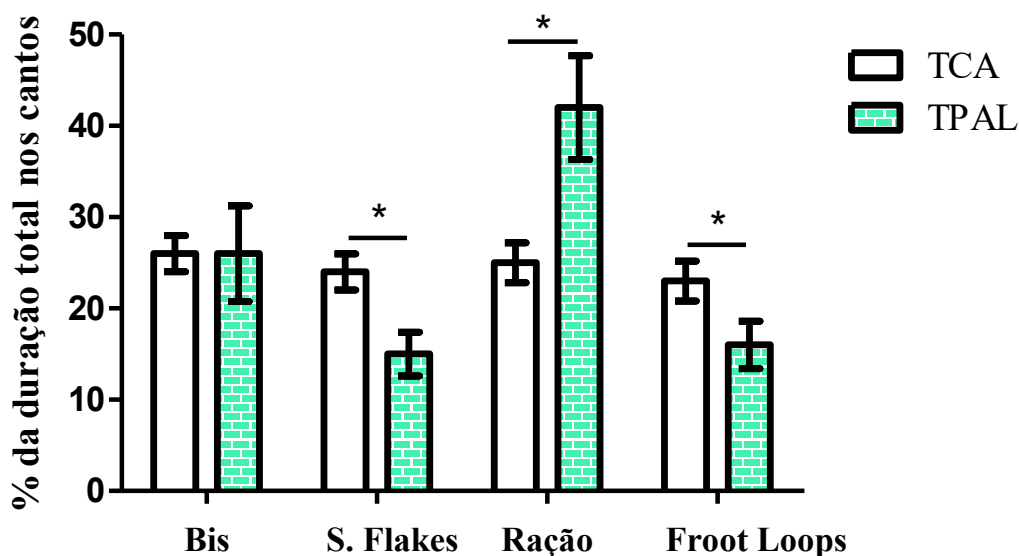


Legenda: Exploração dos cantos da arena realizada no teste do campo aberto (TCA) e na presença dos alimentos (TPAL). Dados expressos em Média \pm EPM (n=19). *p = 0,03987, teste t pareado.

Os dados acima mostram que há uma variação entre as ratas, revelando que as fêmeas não têm uma concordância quanto o alimento preferido, pelo contrário, aqui a preferência individual se sobressai. Portanto, foi considerado o alimento preferido de cada rata aquele em que teve um maior aumento percentual de exploração do canto em que ela estava presente, esse valor variou entre 6 e 58%. O alimento que mais fêmeas preferiram foi o Bis (n=8), em segundo a ração (n=6), depois o Froot Loops (n=3) e o que menos preferiram foi o Snow Flakes (n=2).

Os machos também apresentaram uma distribuição esperada de duração nos quatro cantos do TCA (Figura 21): a- 26% \pm 2 no canto que possuirá Bis no TPAL, b- 24% \pm 2 no canto que possuirá Snow Flakes, c- 25% \pm 2 no da Ração, d- 23% \pm 2 no de Froot Loops. No TPAL o percentual de exploração foi o mesmo para o Bis, apenas aumentou o erro padrão da média (26% \pm 5, p >0,05, teste t pareado), no canto do Snow Flakes diminuiu para 15% \pm 2, na ração aumentou para 42% \pm 6 e diminuiu no Froot Loops (16% \pm 3).

Figura 21- Preferência dos machos por alimentos

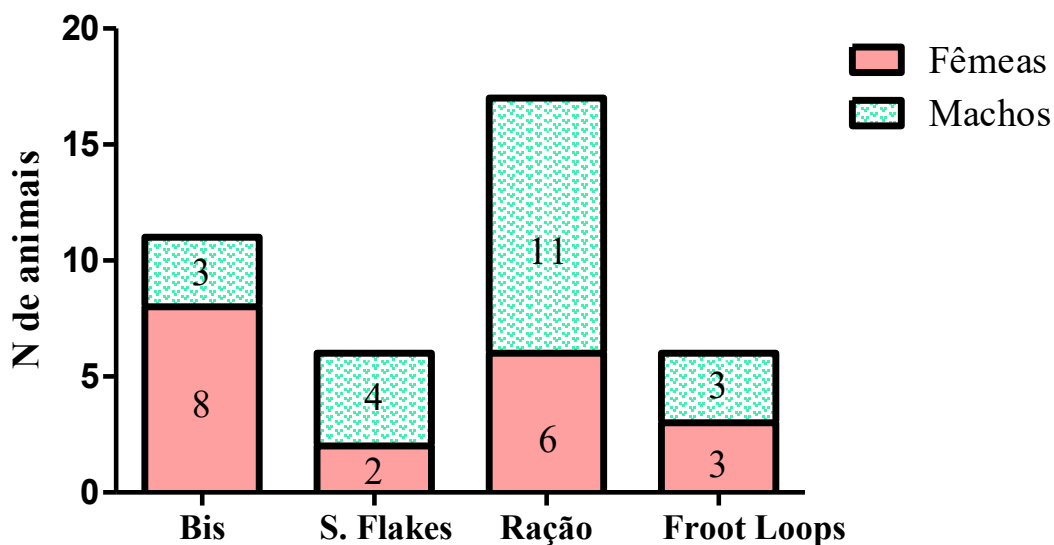


Legendas: Exploração dos cantos da arena realizada no teste do campo aberto (TCA) e na presença dos alimentos (TPAL). Dados expressos em Média \pm EPM (n=21). * $p < 0,05$; teste t pareado.

Os machos também apresentaram variações entre si, enquanto Snow Flakes e Froot Loops parecem ser os alimentos menos preferidos ($p = 0,0066$ e $0,047$; teste t pareado), a ração se sobressai como preferida ($p = 0,010$; teste t pareado). Na verificação de alimento preferido para cada macho, a variação de maior aumento percentual da exploração dos cantos contendo os alimentos foi de 5 a 76%. A maioria dos machos preferiu ração (n=11), o segundo preferido foi Snow Flakes (n=4), e os menos preferidos foram Bis e Froot Loops, com três animais cada.

Na Figura 22 temos o número de animais, separados em machos e fêmeas, que preferem cada opção de alimento. Os alimentos menos preferidos pelos animais foram o Snow Flakes e Froot Loops. O Bis foi o mais preferido pelas fêmeas enquanto a Ração foi a mais preferida pelos machos. A preferência dos machos pela ração foi surpreendente. Especulamos que a ração poderia lembrar a caixa de moradia e, portanto, os sujeitos se sentiriam mais seguros quando próximos a ela. Neste caso é possível que as sessões de familiarização com as várias opções de alimentos anteriormente na casa de moradia não tenham sido suficientes para diminuir a neofobia.

Figura 22- Número de animais por alimentos preferidos



Legenda: Preferência de alimento por animal. Dados expressos em número de animais que apresentaram no canto que continha o alimento (Bis, Snow Flakes, Ração ou Froot Loops) um maior aumento na exploração, calculado pela subtração do percentual de tempo permanecido no TPAL pelo TCA (fêmea n=19, macho n=21).

4.2.5 Teste de Escalada Vertical

Para facilitar a descrição e discussão dos resultados do TEV, reuniu-se os dados dos principais parâmetros (latência e frequência) para o comportamento de maior interesse (escalada) com a divisão dos quatro grupos na **Tabela 1**.

Nessa seção a descrição dos resultados será referente aos comportamentos dos animais dos grupos fêmeas e machos dos subgrupos espontâneos e reforçados nas diferentes sessões do TEV. Caso seja de interesse é possível consultar os dados individuais no APÊNDICE A.

Tabela 1 – Número de escaladores, latência e frequência para a categoria Escalada.

Grupos (tamanho da amostra)	Parâmetro	PT (primeiros 5 min)	T	RT1	RT2
Fêmeas Espontâneas (n=10)	N escaladores	8	9	10	9
	Latência	158,6 s ± 29,5	107,7 s ± 33,62	77,31 s ± 21,98	52,72 s ± 16,62
	Frequência	1,62 ± 0,26	2,2 ± 0,44	2,4 ± 0,5	2,55 ± 0,41
Fêmeas Reforçadas (n=9)	N escaladores	3	6	8	8
	Latência	218,8 s ± 63,9	75,05 s ± 27,79	87,48 s ± 35,02	35,81 s ± 13,74
	Frequência	1,33 ± 0,33	3,5 ± 0,76	2,75 ± 0,49	4 ± 0,5
Machos Espontâneos (n=11)	N escaladores	3	3	2	2
	Latência	113,3 ± 47,3	114,02 s ± 20,38	27,25 s ± 9,88	63,24 s ± 39,71
	Frequência	1,67 ± 0,67	1,66 ± 0,33	3 ± 1	4,5 ± 1,5
Machos Reforçados (n=10)	N escaladores	0	2	2	3
	Latência	-	131,98 s ± 108,8	138,3 s ± 83,4	148,73 s ± 55,63
	Frequência	-	2 ± 1	1,5 ± 0,5	1,67 ± 0,67

Legenda: PT= pré-teste; T= teste; RT1= reteste1; RT2= reteste2. Dados expressos em $\bar{x} \pm \text{EPM}$ (n de animais que realizaram o comportamento). Elaborado pela autora.

4.2.5.1 Resultados da sessão Pré-teste do TEV

Nessa sessão os ratos, fêmeas e machos, tiveram o primeiro contato com o aparato que continha a caixa base na posição intermediária e uma mistura de alimentos palatáveis no abrigo no topo da escada. Nem todos os animais escalaram a escada nesta sessão.

O local que as ratas mais exploraram foi a caixa, passando em média 85% do tempo da sessão nela e aproximadamente 6% do tempo tocando a escada. Dezoito das 19 fêmeas escalaram a escada, 11 dessas o fizeram nos primeiros 300 s (ou 5 min) de sessão (Tabela 1), 6 entre os 300 e 600 s (ou 5 e 10 min), e 1 nos últimos 300 s (ou entre 10 e 15 min). A média \pm EPM de latência para escalada apresentada pelas fêmeas foi de 325,77 s \pm 51,08; e a frequência 3,42 \pm 0,46. Nos primeiros 300 s de sessão 5 fêmeas chegaram ao abrigo. Seis fêmeas alcançaram o abrigo entre 300 e 600 s, sendo que 3 delas já haviam explorado o abrigo nos primeiros 300 s. Nos últimos 300 s, 5 das 6 fêmeas que alcançaram o abrigo entre 300 e 600 o fizeram novamente.

O local que ratos mais exploraram também foi a caixa, passando em média 93% do tempo da sessão nela e aproximadamente 6% do tempo tocando a escada. Uma menor quantidade de machos escalou a escada comparada às fêmeas. De 21 machos apenas 7 (6 do “futuro” grupo Espontâneo e 1 do “futuro” grupo Reforçado) escalaram, 3 desses o fizeram nos primeiros 300 s de sessão (Tabela 1), 3 entre 300 e 600 s, e apenas 1 nos 300 s finais. A média \pm EPM de latência para escalada apresentada por todos os machos foi de $699,92 \text{ s} \pm 68,19$; e a frequência $0,71 \pm 0,34$. Para os machos que escalaram, a latência foi de $299,77 \text{ s} \pm 80,43$ e frequência de $2,14 \pm 0,82$. Em nenhum momento dos 900 s de pré-teste algum macho alcançou o abrigo.

4.2.5.2 Resultados e da sessão Teste do TEV

A partir da sessão de teste os machos e fêmeas foram alocados para o grupo “Espontâneo” ou “Reforçado”, e a descrição dos resultados a partir daqui será feita da mesma maneira.

As fêmeas do grupo Espontâneo permaneceram na caixa 78% do tempo da sessão, e 8% do tempo tocando a escada. Das 10 fêmeas desse grupo, 9 escalaram com uma média \pm EPM da latência de $107,70 \text{ s} \pm 33,62$ e frequência de $2,2 \pm 0,44$ entre elas (Tabela 1). Das 9 fêmeas que escalaram, 5 alcançaram o abrigo e apresentaram uma frequência média de $2,2 \pm 0,42$. As fêmeas do grupo Reforçado permaneceram também 78% do tempo da sessão na caixa e 7% do tempo tocando a escada. Seis de 9 fêmeas desse grupo escalaram com latência de $75,05 \text{ s} \pm 27,79$ e frequência de $3,5 \pm 0,76$ (Tabela 1). Dessas 6 fêmeas que escalaram, apenas 2 chegaram ao abrigo, uma delas sete vezes e a outra duas.

Os machos do grupo Espontâneo permaneceram na caixa em média 91% do tempo da sessão, e 7% do tempo tocando a escada. De 11 apenas 3 escalaram com latência de $114,02 \text{ s} \pm 20,38$ e frequência de $1,66 \pm 0,33$ (Tabela 1). Nenhum desses animais alcançou o abrigo. Os machos do grupo Reforçado permaneceram na caixa em média 89% do tempo da sessão, e 8% do tempo tocando a escada. Nesse grupo, 2 de 10 animais escalaram com a latência média de $131,98 \text{ s} \pm 108,8$ e frequência de 2 ± 1 (Tabela 1). Apenas um desses animais alcançou o abrigo.

4.2.5.3 Resultados da sessão Reteste 1 do TEV

As fêmeas do grupo Espontâneo passaram em média 77% do tempo na caixa e 7% tocando a escada. As dez escalaram, com latência média de $77,31 \text{ s} \pm 21,98$ e frequência média de $2,4 \pm 0,5$ (Tabela 1). Oito delas alcançaram o abrigo com frequência média de $1,88 \pm 0,44$. As fêmeas do grupo Reforçado passaram em média 78% do tempo na caixa e 8% tocando a escada. Um vídeo do grupo nessa sessão foi perdido, porém, todas as 8 fêmeas restantes escalaram com latência média de $87,48 \text{ s} \pm 35,02$ e frequência de $2,75 \pm 0,49$ (Tabela 1). Dessas, 2 alcançaram o abrigo, com uma frequência de 4 e 2.

Os machos do grupo Espontâneo passaram em média 90% do tempo na caixa e 6% tocando a escada. Um vídeo desse grupo também foi perdido, sobrando dados de dez animais. Desses, 2 animais escalaram (latência $27,25 \text{ s} \pm 9,88$ e frequência 3 ± 1 , Tabela 1), um desses alcançou o abrigo duas vezes. Os machos do grupo Reforçado passaram em média 91% do tempo na caixa e 6% tocando a escada. Dos dez animais, também 2 animais escalaram (latência $138,3 \text{ s} \pm 83,4$ e frequência $1,5 \pm 0,5$, Tabela 1) e um alcançou o abrigo duas vezes.

4.2.5.4 Resultados da sessão Reteste 2 do TEV

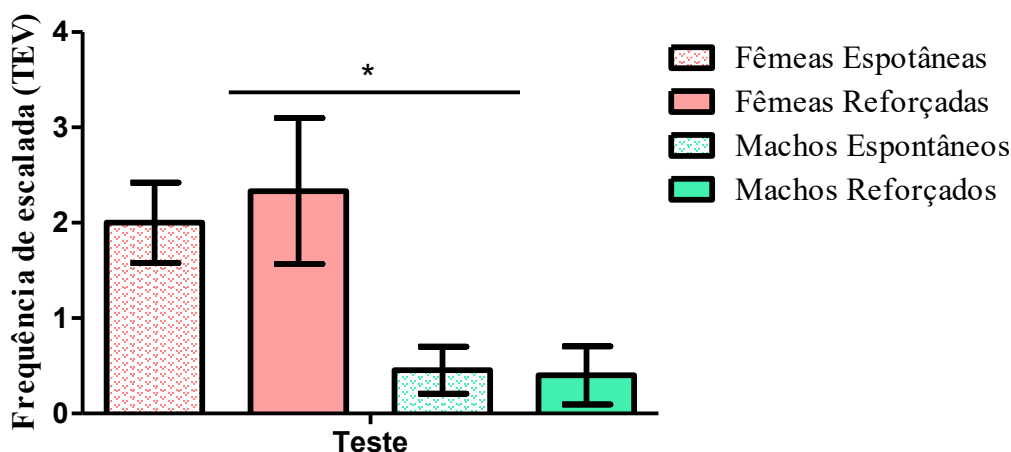
Nessa última sessão, semelhante as duas últimas, as fêmeas do grupo Espontâneo passaram em média 78% do tempo na caixa e 8% tocando a escada. Nove das 10 fêmeas escalaram (latência de $52,72 \text{ s} \pm 16,62$ e frequência $2,55 \pm 0,41$, Tabela 1). Seis delas alcançaram o abrigo com uma frequência média de $2,5 \pm 0,42$. As fêmeas reforçadas passaram em média 74% do tempo na caixa e 8% tocando a escada. Oito de 9 ratas escalaram (latência $35,81 \text{ s} \pm 13,74$ e frequência $4 \pm 0,5$, Tabela 1), quatro delas chegaram no abrigo com uma frequência de $3 \pm 1,1$ entre elas.

Os machos do grupo Espontâneo passaram em média 85% do tempo na caixa e 9% tocando a escada. Dois dos 11 machos do grupo escalaram (latência $63,24 \text{ s} \pm 39,71$ e frequência $4,5 \pm 1,5$, Tabela 1) e um deles alcançou o abrigo seis vezes. Os machos do grupo Reforçado ficaram em média 90% do tempo na caixa e 7% tocando a escada. Três animais desse grupo escalaram (latência de $148,73 \text{ s} \pm 55,63$ e frequência $1,67 \pm 0,67$, Tabela 1) e um deles alcançou o abrigo uma vez.

4.2.5.5 Efeitos do sexo, repetição e reforço no TEV

Para avaliar o efeito dos alimentos palatáveis sobre a motivação para escalar foi comparada a frequência de escalada entre os grupos de fêmeas e machos Espontâneos ou Reforçados na sessão teste (Figura 23), e apenas o fator sexo teve influência significativa sobre a frequência de escalada ($F(1,36) = 14,82$; $p = 0,00046$; Partial eta-squared = 0,2916; ANOVA de duas vias), o fator alimento palatável não teve efeito significativo ($F(1,36) = 0,0952$; $p = 0,7595$; Partial eta-squared = 0,002637; ANOVA de duas vias), nem a interação entre os fatores ($F(1,36) = 0,1842$; $p = 0,6703$; Partial eta-squared = 0,005; ANOVA de duas vias).

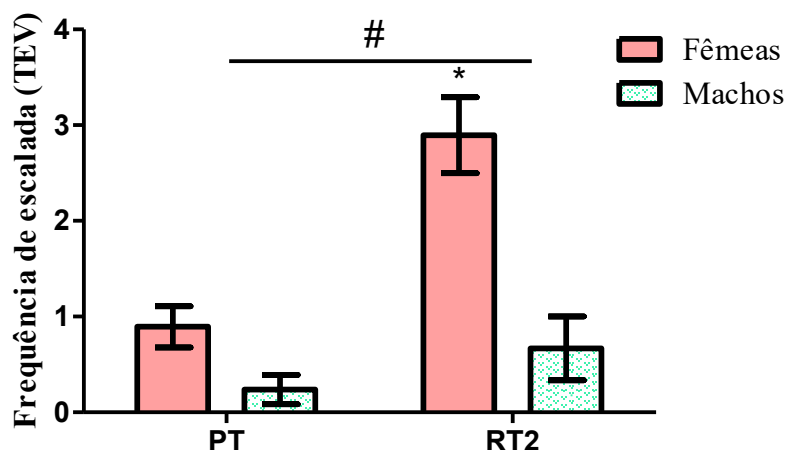
Figura 23- Comparação entre grupos na sessão de teste



Legenda: Dados expressos em média \pm EPM (fêmeas espontâneas $n=10$, fêmeas reforçadas $n=9$, machos espontâneos $n=11$, machos reforçados $n=10$). * $p = 0,00046$; ANOVA de duas vias.

Para verificar o efeito do sexo e repetição da escalada sobre o aprendizado da tarefa, foi realizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas da frequência de escalada dos 5 primeiros minutos do pré-teste e reteste2 (Figura 24). Tanto o sexo ($F(1,38) = 18,67$; $p = 0,0001$; Partial eta-squared = 0,3294) quanto a repetição do teste ($F(1,38) = 26,88$; $p = 0,000007$; Partial eta-squared = 0,4143) tiveram efeito significativo sobre o aprendizado de escalada dos animais. A interação entre os fatores sexo e repetição do teste também foi significativa $F(1,38) = 11,26$; $p = 0,0018$; Partial eta-squared = 0,2285).

Figura 24- Aprendizado com a repetição do teste



Legenda: Dados expressos em média \pm EPM (fêmeas n=19, machos n=21).
 * $p = 0,0001$, # $p = 0,000007$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

4.2.5.6 Discussão TEV

Dos animais que escalaram no pré-teste (n=25) a maioria o fizeram nos primeiros 300 s de sessão (n=14) e esperava-se que, com a repetição do teste a latência para escalada diminuísse (Tabela 1), uma vez que os animais já haviam tido contato com o aparato. E como esperado, a latência para escalada dos animais no teste diminuiu em comparação ao pré-teste, e mais animais escalaram na sessão de teste (n=20) que nos primeiros 300 s de pré-teste (n=14, Tabela 1), mostrando que 300 s de sessão de teste são suficientes para avaliar os comportamentos de interesse nos animais.

Na primeira exposição ao aparato as fêmeas logo mostraram uma maior facilidade em escalar que os machos e tiveram uma maior frequência dessa categoria. Algumas ratas (n=8) apresentaram uma persistência em realizar a tarefa, evidenciada pela chegada ao abrigo, enquanto nenhum macho apresentou esse comportamento nenhuma vez no pré-teste. Esses resultados, junto aos presentes nas figuras 23 e 24 corroboram ao achado na literatura, no trabalho de Huck e Price (1976) tanto ratas de laboratório quanto selvagens se mostraram mais motivadas para escalar que os machos nas mesmas condições.

As fêmeas do grupo Espontâneo mostraram uma tendência a escalar precedente ao teste, pois na sessão de pré-teste com as mesmas condições para os dois grupos, mais ratas do grupo Espontâneo já se mostravam escaladoras nos primeiros 300 s de sessão. Observa-se um aumento no número de fêmeas do grupo Reforçado escalando nos 300 s disponíveis nas outras

sessões (Tabela 1), esse aumento acompanha a diminuição na latência para escalada, e ambos podem ser atribuídos a repetição do teste.

No presente trabalho, para os machos, os parâmetros não tiveram grandes mudanças entre as exposições (Tabela 1, figura 24), indicando pouco valor da repetição do teste para eles, enquanto para as fêmeas o efeito da repetição sobre o aprendizado é evidente (Tabela 1, figura 24). De todos os machos que escalaram nas sessões, apenas um de cada grupo chegou até o abrigo, o do Espontâneo (L2-M-CX3-A1) em duas sessões (reteste 1 e 2) e o do Reforçado (L1-M-CX3-A0) em três (teste, reteste 1 e reteste 2).

É possível que, para o aprendizado dos machos, um protocolo com maior número de sessões ou com menor intervalo entre elas seja mais efetivo, e mesmo a escalada sendo um comportamento natural aos ratos, o treinamento é necessário para que alguns animais aprendam a realiza-la. Talvez a menor quantidade de machos escaladores também possa ser atribuída a maior massa corporal desses animais e conseqüente uma maior dificuldade em realizar a escalada. Os resultados obtidos no presente trabalho poderiam ter sido distintos se os machos submetidos ao TEV fossem mais jovens, no trabalho de Makowska e Weary (2016) foi observado um declínio da frequência e duração do comportamento de escalada em ratos com o aumento da idade.

Os resultados também revelam o baixo valor reforçador dos alimentos palatáveis sobre a atividade proposta tanto para os machos quanto para as fêmeas, e ao contrário do que se esperava, o uso desses alimentos como recompensa com o protocolo experimental utilizado (sem privações) não foi o suficiente para motivar a escalada dos animais. Talvez a aplicação de um reforço de maior saliência e valor (BERRIDGE; ROBINSON, 1998) fizesse com que os animais aumentassem a frequência da atividade proposta, é possível que um reforço que envolva motivação sexual, com adição de um tecido com cheiro de outros ratos no abrigo, tenha uma saliência e valor reforçador maior.

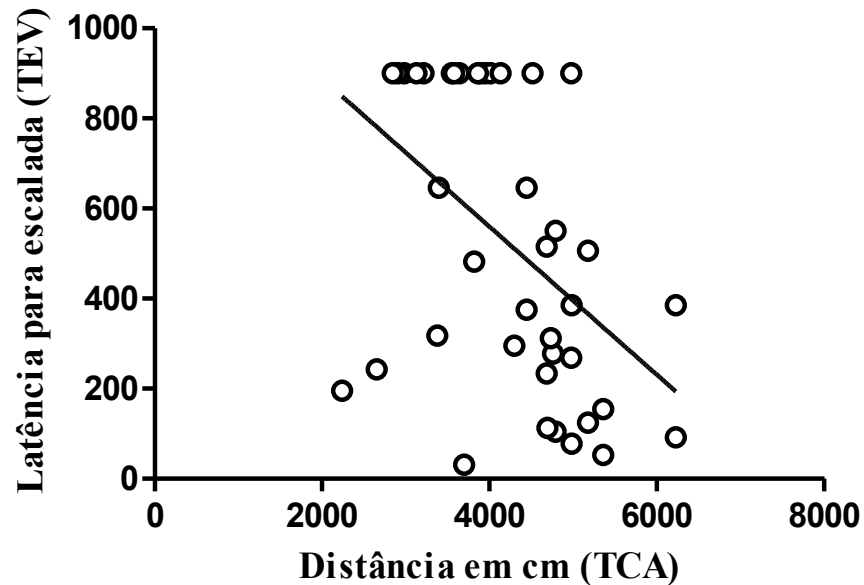
4.2.6 Perfil dos animais experimentais

Para verificar se existe um perfil de animais mais ativos e menos ativos, e se isso influenciaria sobre a realização da escalada no TEV, fez-se a correlação entre parâmetros do TCA e TEV.

A Figura 25 mostra uma correlação negativa moderada estatisticamente significativa entre a distância percorrida no TCA com a latência para escalada no pré-teste do TEV ($r = -0,4948$; $p = 0,0012$).

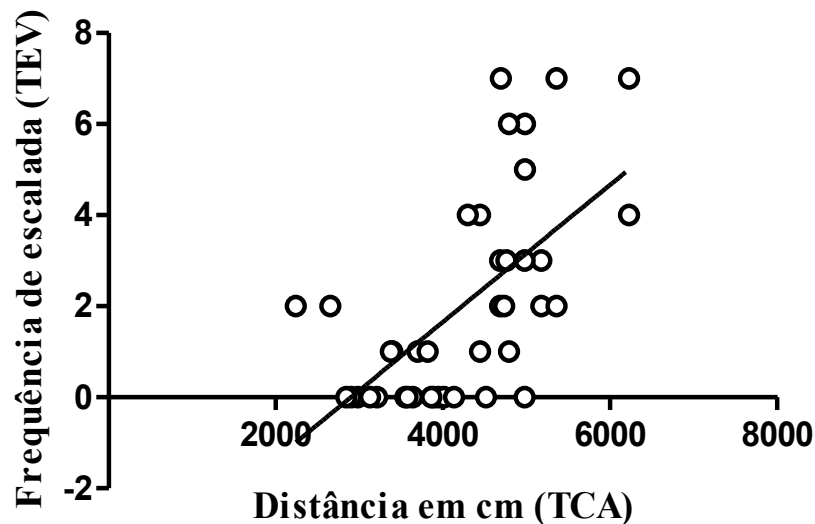
A Figura 26 mostra uma correlação positiva moderada estatisticamente significativa entre a distância percorrida no TCA com a frequência de escalada no pré-teste do TEV ($r = 0,6466$; $p < 0,0001$). Porém as correlações foram feitas para todos animais, e nem todos eles escalaram, principalmente os machos, alterando assim o valor do r .

Figura 25 - Correlação entre latência para escalada e locomoção



Legenda: Correlação entre distância total percorrida pelos animais e latência para escalada no pré-teste do TEV ($n=40$; r de Spearman = -04948 ; $p = 0,0012$).

Figura 26 - Correlação entre frequência de escalada e locomoção



Legenda: Correlação entre distância total percorrida pelos animais e frequência de escalada no pré-teste do TEV ($n=40$; r de Spearman = $0,6466$; $p = 0,0001$).

5 CONCLUSÃO

Os resultados do experimento piloto possibilitaram ajustes experimentais e estruturais, e melhoramento do catálogo comportamental, viabilizando a aplicação do TEV em ratos. Assim como na literatura, no presente trabalho as fêmeas se locomoveram mais no TCA que os machos, porém, divergindo da literatura, elas exploraram menos a área central da arena que eles. Com o TPAL foi possível estimar qual o alimento preferido de cada animal, apenas não se esperava que uma grande parte deles preferissem ração a alimentos palatáveis.

As ratas apresentaram uma tendência maior a escalar que os machos. Os alimentos palatáveis alocados no abrigo não têm um valor de reforço o suficiente para estimular a realização da tarefa. A repetição do teste parece ter um papel sobre aprendizado da tarefa. O perfil do animal, ativo ou não, parece ter uma influência sobre a escalada. As diferenças comportamentais entre fêmeas e machos nos testes ressaltam a importância da realização de procedimentos experimentais utilizando animais de ambos os sexos.

Para a utilização do TEV na análise de motivação em ratos se tornar possível, refinações no teste ainda precisam ser feitas. Com os experimentos realizados no presente trabalho foi possível chegar em algumas condições experimentais apropriadas para a realização do teste, como a altura intermediária da caixa, iluminação na cor vermelha e duração de cinco minutos das sessões. Porém o reforço com alimentos palatáveis, que achávamos ser o suficiente para motivar a escalada dos animais sem aplicação de privações, não foi o suficiente para motivar a escalada tanto das fêmeas quanto dos machos. As fêmeas realizaram o comportamento de escalada com maior facilidade, e as poucas e espaçadas repetições do teste teve um fundamental sobre o aprendizado delas, enquanto nos machos a atividade em si não foi natural, ao contrário do que se esperava inicialmente. Para experimentos futuros seria interessante criar um outro protocolo de treinamento com uma maior frequência de exposição de ratos machos ao aparato, além da utilização desses animais mais jovens. E também utilizar um incentivo saliente e de maior valor para motivar a escalada dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, E. D. et al. Differential Effect of Stress on In Vivo Dopamine Release in Striatum, Nucleus Accumbens, and Medial Frontal Cortex. **Journal of Neurochemistry**. p. 1655–1658, 1989.
- ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behavioral Biology**, v. 14, n. 4, p.451-479, ago. 1975. Elsevier BV.
- BAILEY, M. R. et al. A novel strategy for dissecting goal-directed action and arousal components of motivated behavior with a progressive hold-down task. **Behavioral Neuroscience**, v. 129, n. 3, p.269-280, 2015.
- BELOVA, M. A.; PATON, J. J.; SALZMAN, C. D. Moment-to-Moment Tracking of State Value in the Amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 40, p. 10023–10030, 2008.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. Parsing reward. **Trends In Neurosciences**, v. 26, n. 9, p.507-513, set. 2003. Elsevier BV.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience ? **Brain Research Reviews**, p.309-369, 1998.
- BOLLES, Robert C.; HAYWARD, Linda; CRANDALL, Christian. Conditioned Taste Preferences Based on Caloric Density. **Journal Of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 7, p.59-69, 1981.
- BURKE, Nikita N. et al. Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. **Physiology & Behavior**, v. 167, p.28-34, dez. 2016.
- CASTANON, N. et al. Maturation of the Behavioral and Neuroendocrine Differences Between the Roman Rat Lines. **Physiology & Behavior**, v. 55, n. 4, p.775-782, 1994.
- COLLINS, F.S.; TABAK, L.A. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. **Nature**, v. 505, n. 7485, p.612-613, 2014.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2016.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016.
- CRISPIM JUNIOR, C.F. et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, v. 42, n. 2, p.257-264, fev. 2012. Elsevier BV.
- DER-AVAKIAN, A. et al. Translational Assessment of Reward and Motivational Deficits in Psychiatric Disorders. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 28, p. 231–62, 2016.
- DOMINGUES, K. et al. Repeated forced-swimming test in intact female rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, n. 6, p.509-518, mar. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

DOWD, E.C. et al. Probabilistic Reinforcement Learning in Patients With Schizophrenia: Relationships to Anhedonia and Avolition. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 1, n. 5, p.460-473, set. 2016. Elsevier BV.

HODOS, W. Progressive Ratio as a Measure of Reward Strength Abstract. **Science**, v. 134, n. 2, p. 943–944, 1961.

HUCK, U.W.; PRICE, E.O. Effect of the post-weaning environment on the climbing behaviour of wild and domestic Norway rats. **Animal Behaviour**, v. 24, n. 2, p.364-371, maio 1976.

JONES, C.A.; WATSON, D. J.; FONE, K. C. Animal models of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p.1162-1194, 2011.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, 1990.

LOVE, T. M. Oxytocin, Motivation and the Role of Dopamine. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, p. 49–60, 2015.

LUO, A. H et al. Linking Context with Reward: A Functional Circuit from Hippocampal CA3 to Ventral Tegmental Area. **Science**, v. 333, n. 6040, p. 353–357, 2011.

MAKOWSKA, I.J.; WEARY, D.M. The importance of burrowing, climbing and standing upright for laboratory rats. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 6, p.160136, 2016.

MASUR, Jandira. Sex differences in “emotionality” and behavior of rats in the open-field. **Behavioral Biology**, v. 7, n. 5, p.749-754, out. 1972. Elsevier BV.

MEZADRI, T.J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p.200-205, fev. 2011. Elsevier BV.

MOLINA-HERNANDEZ, M.; TELLEZ-ALCANTARA, P.; PEREZ-GARCIA, J. Isolation rearing induced fear-like behavior without affecting learning abilities of Wistar rats. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 25, n. 5, p.1111-1123, jul. 2001. Elsevier BV.

MOSCARELLO, J. M.; BEN-SHAHAR, O.; ETTEMBERG, A. Effects of food deprivation on goal-directed behavior, spontaneous locomotion, and c-Fos immunoreactivity in the amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 9–15, 2009.

MUSCAT, R.; WILLNER, P. Effects of dopamine receptor antagonists on sucrose consumption and preference. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 1, p.98-102, 1989. Springer Nature.

NALL, R. W.; RUNG, J. M.; SHAHAN, T. A. Resurgence of a target behavior suppressed by a combination of punishment and alternative reinforcement. **Behavioural Processes**, v. 162, p. 177–183, 2019.

NETO, W.L.; SILVA, W.A.; CIENA, A.P.; ANARUMA, C.A.; GAMA, E.G. Vertical Climbing for Rodent Resistance Training: A Discussion about Training Parameters. **International Journal of Sports Science & Coaching**, v. 6, p.36, 2016.

NUNES, E.A.; HALLAK, J.E.C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 17, n. 3, p.528-543, set. 2014.

PATTI, C. L. et al. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 4, p. 923–927, 2005.

PENROD, B.; WALLACE, M.D.; DYER, E.J. Assessing Potency of High- and Low-Preference Reinforcers with Respect to Response Rate and Response Patterns. **Journal of Applied Behavior Analysis**, v. 41, n. 2, p.177-188, 2008. Society for the Experimental Analysis of Behavior.

PIZZAGALLI, D. A. et al. Euthymic patients with bipolar disorder show decreased reward learning in a probabilistic reward task. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 162–8, 15 jul. 2008.

POSSAMAI, F. et al. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 58, p. 15–21, 2014.

RUSHWORTH, M. F. S. et al. Review Frontal Cortex and Reward-Guided Learning and Decision-Making. **Neuron**, v. 70, n. 6, p. 1054–1069, 2011.

SALAMONE, J. D. et al. Activational and effort-related aspects of motivation: Neural mechanisms and implications for psychopathology. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1325–1347, 2016.

SALAMONE, J. D. et al. Nucleus Accumbens Dopamine and the Forebrain Circuitry Involved in Behavioral Activation and Effort-Related Decision Making: Implications for Understanding Anergia and Psychomotor Slowing in Depression. **Current Psychiatry Reviews**, v. 2, n. 2, p. 267–280, 2006.

SALAMONE, J.D. et al. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. **Psychopharmacology**, v. 191, p.461–482, 2007.

SALAMONE, J.D. et al. Mesolimbic Dopamine and the Regulation of Motivated Behavior. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 27, p.231-257, 2015.

SALAMONE, J.D.; COUSINS, M.S.; BUCHER, S. Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. **Behavioural Brain Research**, v. 65, n. 2, p.221-229, dez. 1994. Elsevier BV.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic Amines and Emotion: Pharmacological studies suggest a relationship between brain biogenic amines and affective state. **Science**. v. 156, n. 3771, p. 21–30, 1967.

SCHOLL, J. L. et al. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. **Physiology & Behavior**, v. 211, p.1-8, nov. 2019.

SIDMAN, M. The distinction between positive and negative reinforcement: Some additional considerations. **Behavior Analyst**, v. 29, n. 1, p. 135–139, 2006.

TAPIA, M. A. et al. Sex differences in hedonic and homeostatic aspects of palatable food motivation. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p.396-400, fev. 2019. Elsevier BV.

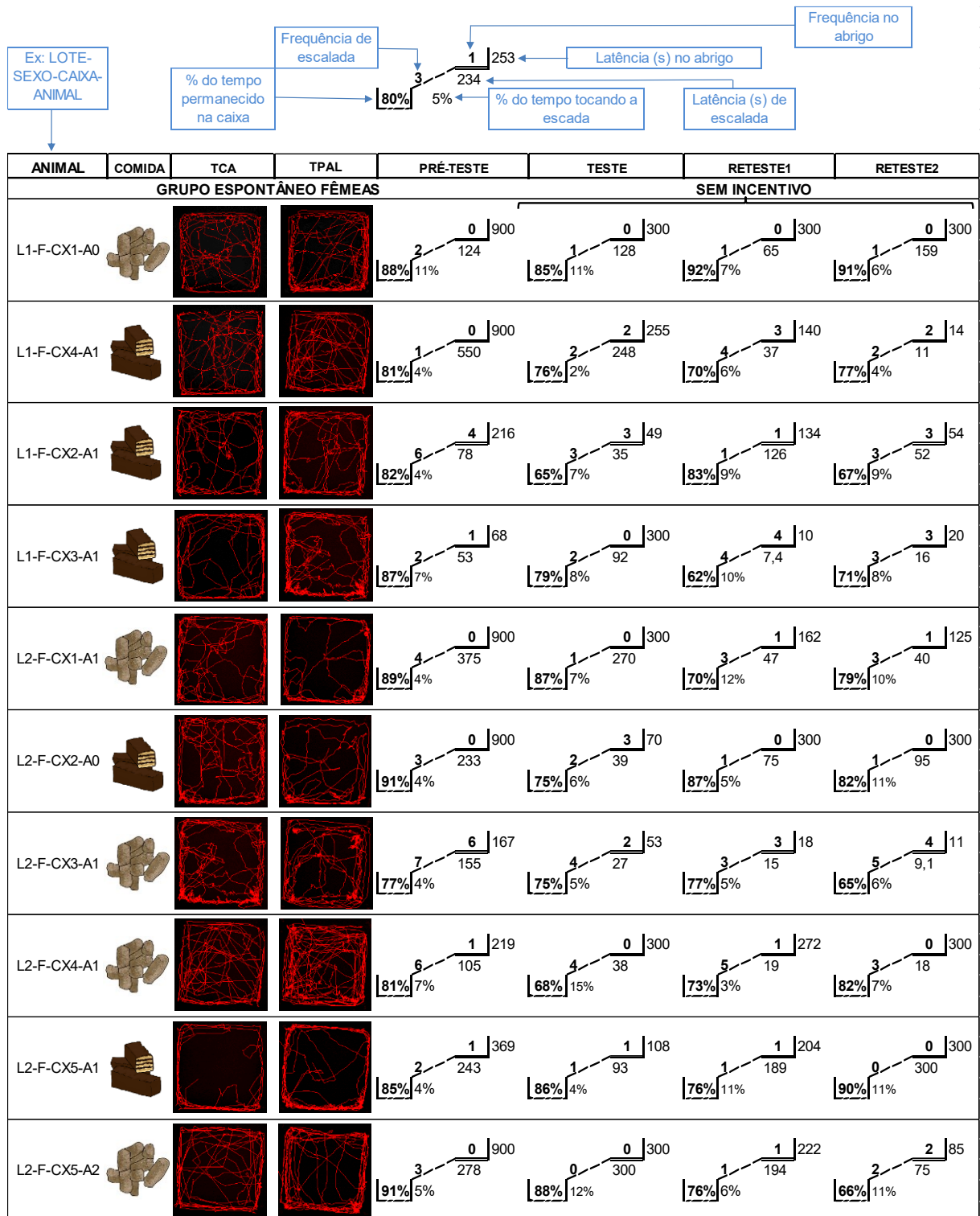
VALLE, F. P.; GORZALKA, B. Open-field sex differences prior to puberty in rats. **Bulletin Of The Psychonomic Society**, v. 16, n. 6, p.429-431, dez. 1980.

WARD, R.D. Methods for Dissecting Motivation and Related Psychological Processes in Rodents. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v.27, p.451-470, 2015.

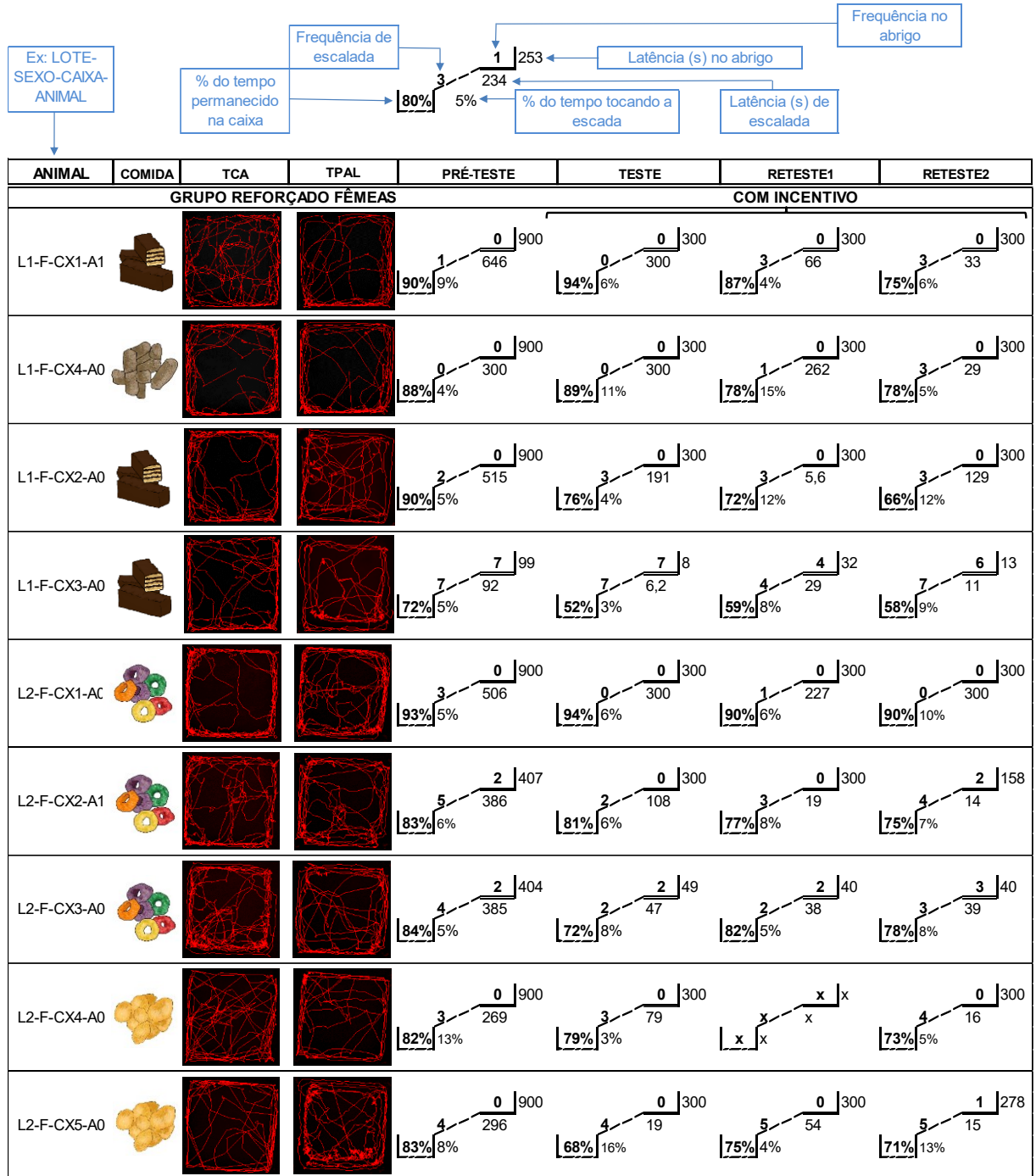
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. 2017.

APÊNDICE A – Histórico dos animais

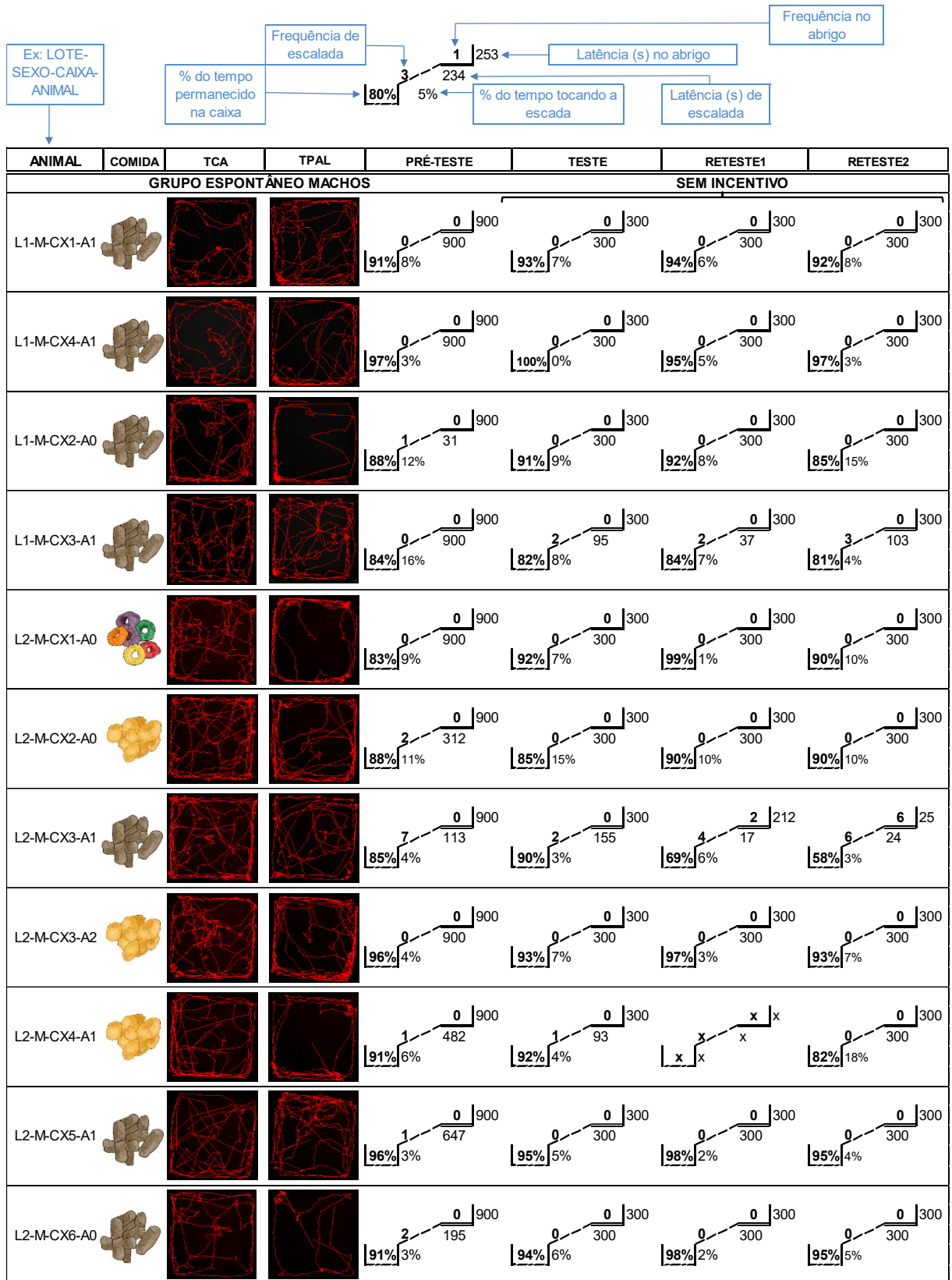
Continua



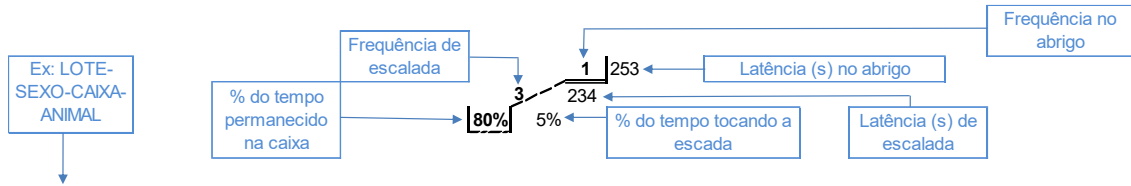
Continuação



Continuação



Conclusão



ANIMAL	COMIDA	TCA	TPAL	PRÉ-TESTE	TESTE	RETESTE1	RETESTE2
GRUPO REFORÇADO MACHOS				COM INCENTIVO			
L1-M-CX1-A0				93% 7% 0 900	94% 6% 0 300	94% 6% 0 300	90% 10% 0 300
L1-M-CX4-A0				87% 4% 0 900	88% 12% 0 300	91% 9% 0 300	89% 11% 0 300
L1-M-CX2-A1				93% 6% 1 318	82% 18% 0 300	87% 11% 1 222	92% 8% 0 300
L1-M-CX3-A0				90% 10% 0 900	62% 6% 3 272	75% 4% 2 73	80% 12% 1 66
L2-M-CX1-A1				97% 3% 0 300	90% 10% 0 300	85% 15% 0 300	87% 9% 1 249
L2-M-CX2-A1				95% 5% 0 900	90% 5% 1 241	99% 1% 0 300	84% 8% 3 141
L2-M-CX3-A0				98% 2% 0 900	99% 1% 0 300	99% 1% 0 300	99% 1% 0 300
L2-M-CX4-A0				95% 5% 0 900	94% 6% 0 300	98% 2% 0 300	96% 4% 0 300
L2-M-CX5-A0				93% 5% 0 900	93% 7% 0 300	91% 9% 0 300	96% 4% 0 300
L1-M-CX6-A1				96% 4% 0 900	93% 7% 0 300	94% 6% 0 300	92% 8% 0 300