



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

Yulla Christoffersen Knaus

**Criatividade sob pressão:**

**Desempenho de ratas da linhagem High Anxiety-type Behaviour no teste de  
Cavar e Escalar**

São Paulo

2021

YULLA CHRISTOFFERSEN KNAUS

**Criatividade sob pressão:**

**Desempenho de ratas da linhagem High Anxiety-type Behaviour no teste de  
Cavar e Escalar**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Instituto de  
Psicologia  
da Universidade de São Paulo para obter  
o título de Doutora em Ciências.

Programa de Neurociências e  
Comportamento

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia-  
Mijares

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo  
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Christoffersen Knaus, Yulla

Criatividade sob pressão: Desempenho de ratas da linhagem High Anxiety-type Behavior no teste de Cavar e Escalar / Yulla Christoffersen Knaus; orientador Miriam Garcia-Mijares. -- São Paulo, 2021.

123 f.

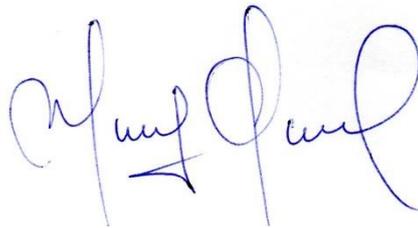
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Resolução de Problemas. 2. Ansiedade. 3. Neuroendocrinologia. 4. Modelos animais de ansiedade. 5. Recombinação de Repertórios. I. Garcia-Mijares, Miriam, orient. II. Título.

Nome: Knaus, Yulla Christoffersen

Título: Criatividade sobre pressão: Desempenho de ratas da linhagem High Anxiety-type Behaviour no teste de Cavar e Escalar

Tese apresentada ao Instituto  
de Psicologia da Universidade  
de São Paulo para obtenção do  
título de Doutora em Ciências



Aprovado em: 27/08/2021

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Profa. Dra.

Instituição:

Julgamento:

Prof.Dr.

Instituição:

Julgamento:

Profa. Dra.

Instituição:

Julgamento:

Prof.Dr.

Instituição:

Julgamento:

*A todas as cientistas em cujos ombros metafóricos me apoiei*

Agradeço:

A CAPES pelo financiamento fornecido, o qual custeou o desenvolvimento desta pesquisa;

A todos da do Laboratório Neumann na Universität Regensburg, por terem me recebido, em especial a equipe técnica pelo auxílio provido;

A USP, por ter sido minha casa-nem-tão-longe-de-casa por todos esses anos;

A todos do saudoso laboratório de psicofarmacologia, hoje renovado como LABIC, por terem me auxiliado nesta jornada, desde quando apareci lá pela primeira vez, tantos anos atrás,

Agradeço especialmente a prof. Dr. Miriam Garcia-Mijares, por tudo que me ensinou e pelo carinho. Não seria a mesma pesquisadora sem sua orientação,

Agradeço a todos de minha família pelo apoio, assim como aos amigos que me aguentaram por esses árduos anos;

A Dr. Hernando, Dr. Jambu e Jurubeba (sem título), por terem sido a melhor equipe de suporte acadêmico-emocional possível,

E, por uma última vez, agradeço ao Batman por proteger Gotham City :)

## Resumo

Knaus, Y. C. (2021) Criatividade sobre pressão: Desempenho de ratas da linhagem High Anxiety-type Behaviour no teste de Cavar e Escalar. Tese de doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A ansiedade foi selecionada evolutivamente e possui função adaptativa de preparar o indivíduo para ameaças, assim como detectá-las. Quando essas respostas se tornam desajustadas em relação ao ambiente, entretanto, fala-se de transtorno de ansiedade, uma série de condições com padrões comportamentais e fisiológicos parecidos. A ansiedade, patológica ou situacional, impacta a cognição de diversas maneiras, incluindo déficits associados a flexibilidade comportamental e a aquisição de relações discriminativas. O presente estudo buscou investigar se este impacto cognitivo se traduziria em um efeito sobre a capacidade de resolução de problemas, em especial no modelo de recombinação de repertórios. Para tal, ratas (*Rattus norvegicus*) de linhagens com diferentes perfis de comportamento tipo ansiedade foram submetidas ao protocolo de cavar e escalar. No primeiro Experimento, foi demonstrada a diferença entre linhagens de alta (HAB) e baixa (LAB) ansiedade, assim como entre diferentes qualidades de treino, quanto ao desempenho na situação teste. Animais HAB resolveram o teste com frequência muito menor do que animais LAB. Em seguida, no Experimento II, ajustes à caixa experimental e protocolo foram feitos, visando tornar a tarefa menos aversiva para animais HAB. Embora algumas modificações tenham obtido um efeito positivo sobre a aquisição dos repertórios, o treino de cavar mais extenso resultou em menor taxa de resolução em ambas as linhagens. No Experimento III, manipulações nos níveis de corticosterona circulante foram feitas em animais HAB, LAB e também animais com perfil 'normal' em relação à ansiedade (NAB). Esses animais receberam tratamento em forma de veículo, corticosterona (10 mg/kg) ou metirapona (50 mg/kg), uma droga que bloqueia a síntese e emissão de corticosteróides. Foi observado efeito de CORT na distribuição do cavar e MET na taxa de solução. No Experimento IV, animais HAB foram expostas repetidas vezes à situação de teste, buscando facilitação da solução; esse processo, entretanto, não afetou a taxa de resolução dos animais HAB. Em todos os Experimentos, são discutidos a alocação do e eficácia do comportamento de cavar como medidas do controle do estímulo "escada" sobre o comportamento de cavar. A partir dos resultados observados, uma curva hipotética de concentração ótima de corticosterona é proposta para a ocorrência de resolução recombinativa, assim como o papel da transferência de controle discriminativo durante a sessão teste.

Palavras-chave: Ansiedade, Recombinação de Repertórios, modelos animais, fêmeas

## ABSTRACT

Knaus, Y. C. (2021) Criativity under pressure: Performance of High Anxiety-type Behaviour female rats on the Dig & Climb Test. Doctorate thesis, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Anxiety was evolutionarily selected and possesses the adaptive function of increasing the odds of an individual detecting threats and being able to deal with them. When these responses become maladapted to the environment, however, Anxiety Disorders take place, a series of conditions with similar behavioural and physiological patterns. Anxiety, whether pathological or situational, impacts cognition in a series of ways, including deficits associated with behavioural flexibility and the acquisition of discriminative relations. The present study sought to investigate if this cognitive impact would translate into an effect upon problem solving ability, specifically upon the interconnection of repertoires model. Thus, female rats (*rattus Norvegicus*) of different strains with different anxiety like behaviour profiles underwent the dig and climb protocol. In the first Experiment, a difference between high (HAB) and low (LAB) anxiety strains was shown, as well as between different qualities of training, in regard to performance on the test situation. HAB animals solved the problem much less often than LAB animals. In the second Experiment, adjustments to the apparatus and protocol were made, with the objective of making the task less aversive to HAB animals. While some modifications bore a positive effect upon the acquisitions of behaviours, the more extensive digging training resulted in a reduction of solution occurrence for both strains. In Experiment III, the blood concentration of corticosteroids was manipulated in HAB, LAB and 'normal' animals (NAB). These animals received vehicle, corticosterone (10 mg/kg) or metyrapone (50 mg/kg), a drug that stops synthesis and secretion of corticosterone. It was observed that CORT affected the distribution of digging and that MET hindered the occurrence of solution. In Experiment IV, HAB animals were repeatedly exposed to the test situation, searching to facilitate the solution; this process, however, did not affect the rate of solution for HAB animals. For all experiments, allocation and efficacy of digging behaviour are discussed as measures of control of the stimulus 'stairs' of digging behaviour. From the results observed, an optimal corticosterone curve for the occurrence of interconnected solution is proposed, as well as what role discriminative control has during testing.

Keywords: Anxiety, Interconnection of behaviours, animal models, females

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Apresentação.....	1
O que é ansiedade?.....	1
Etiologia e Manutenção dos Transtornos de Ansiedade.....	4
<i>Ansiedade, estresse e glicocorticoides.....</i>	4
<i>Ansiedade em fêmeas.....</i>	9
<i>Uma análise funcional do comportamento ansioso .....</i>	11
Ansiedade e Cognição.....	12
<i>Atenção e controle inibitório.....</i>	12
<i>Memória de trabalho e desempenho em tarefas de alta demanda cognitiva...14</i>	
<i>Flexibilidade Comportamental.....</i>	16
Cavar & Escalar – recombinação de cadeias comportamentais e resolução de problemas.....	17
OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	20
EXPERIMENTO 1.....	22
Objetivo .....	22
Método.....	22
Resultados .....	34
Discussão.....	47
EXPERIMENTO 2 .....	50
Objetivo .....	50
Método .....	50
Resultados .....	54
Discussão.....	58
EXPERIMENTO 3.....	64
Objetivo.....	64
Método.....	64
Resultados.....	67
Discussão.....	82
EXPERIMENTO 4.....	86
Objetivo.....	86
Método.....	86

Resultados ....	88
Discussão.....	97
COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE EXPERIMENTOS .....	99
DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXO.....	113

## **Apresentação**

Os transtornos de ansiedade (TAs) tratam-se de uma classe de distúrbios tanto extremamente comuns quanto invasivos quanto ao seu impacto na vida do indivíduo (APA, 2014). A ansiedade afeta muitas facetas da vida para além do sofrimento psíquico; prejuízos em diferentes aspectos da cognição<sup>1</sup> têm sido observados em conjunção com manifestações normais e patológicas de ansiedade. O presente trabalho pretende tratar, especificamente, sobre como o fenótipo ansioso determina o desempenho de ratas fêmeas em uma situação problema que modela comportamento criativo.

Primeiramente será apresentado o conceito de ansiedade, tanto como transtorno mental quanto como um comportamento natural com função adaptativa e evolutivamente selecionado. Em seguida, a etiologia, determinantes endócrinos, ambientais e contingenciais da ansiedade serão apresentados, com especial foco na manifestação de ansiedade em fêmeas. Após, os efeitos da ansiedade sobre o desempenho cognitivo serão descritos, com ênfase em processos comportamentais. Por fim, uma proposta de metodologia para investigar a resolução de problemas criativa é apresentada.

### **O que é a ansiedade?**

A ansiedade, ou condições homólogas a ela, têm sido descritas em textos médicos desde a antiguidade (Crocq, 2015), e é caracterizada principalmente por respostas emocionais (e.g. medo, angústia, apreensão), somáticas (e.g. dor de barriga, sudorese, falta de ar) e uma preocupação com eventos futuros aversivos (Zamignani e Banaco, 2005). A ansiedade exagerada ou excessiva foi categorizada como transtorno patológico no século XIX (Crocq, 2015) e atualmente se trata de um dos distúrbios mentais mais comuns no mundo, com o Brasil em primeiro lugar em questão de incidência de transtornos de ansiedade, com estimada cerca de 9,3% da população acometida em 2017 (Bateson et al., 2011; WHO, 2017).

A quinta e mais recente edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-V (2014) traz a categoria de TAs e os descreve da seguinte forma:

Os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados.

Medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura. Obviamente, esses dois

estados se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada,

<sup>1</sup> No presente trabalho, o termo cognição será usado para referir a mecanismos pelos quais informação oriunda do ambiente é adquirida, processada, guardada e usada como base para ações, tais como percepção, aprendizagem, memória (Shettleworth, 2010)

necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de fuga, e a ansiedade sendo mais frequentemente associada a tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquivia. Às vezes, o nível de medo ou ansiedade é reduzido por comportamentos constantes de esquivia. (APA, 2014, p.189)

Inclusos nos TAs estão as seguintes condições: Transtorno de Ansiedade de Separação, Mutismo Seletivo, Fobia Específica, Transtorno de Ansiedade Social, Transtorno de Pânico<sup>2</sup>, Agorafobia, Transtorno da Ansiedade Generalizada, Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância, Transtorno de Ansiedade Devido a Outra Condição Médica, Outro Transtorno de Ansiedade Especificado e Transtorno de Ansiedade Não Especificado. Esses transtornos diferem entre si primariamente em relação a quais estímulos - objetos ou situações - se encontram associadas a respostas de ansiedade e medo (APA, 2014).

A resposta de ansiedade patológica é complexa e multimodal, sendo composta por uma série de padrões comportamentais e emoções, assim como eventos e percepções somáticas, e flutuações hormonais (Zamignani e Banaco, 2005; APA, 2014). Além de estados emocionais “desagradáveis” relacionados a um evento futuro (Zamignani e Banaco, 2005) de maneira frequentemente considerada desproporcional ao nível de ameaça real do mesmo, também são observadas alterações fisiológicas como taquicardia, fadiga, tensão muscular, dores e tremores, prejuízo na qualidade do sono, sensação de falta de ar e hiperventilação e sudorese (Zamignani e Banaco, 2005, Bateson et al, 2011; APA, 2014). Também são frequentemente observadas alterações como inquietação, irritabilidade e prejuízos de memória e atenção (Zamignani e Banaco, 2005, Bateson et al, 2011; APA, 2014). Os impactos da ansiedade na cognição serão descritos adiante em maior detalhe e possuem uma especial relevância para o presente trabalho.

Apesar do impacto altamente deletério que um TA pode ter sobre a qualidade de vida do indivíduo que sofre do transtorno (APA, 2014), a ansiedade não patológica tem uma função adaptativa (Bateson et al., 2011) e foi evolutivamente selecionada cedo na história filogenética dos vertebrados. De maneira geral, tem sido aceito que a função da ansiedade é a de preparar o indivíduo para ameaças (Martin et al, 2009) e é relacionada à resposta de luta ou fuga. De fato, uma análise funcional dos sintomas e alterações típicos da ansiedade (tabela 1) torna clara essa relação. De maneira geral, os padrões comportamentais típicos

<sup>2</sup>Diferenças importantes em relação aos mecanismos subjacentes ao pânico e a ansiedade foram encontradas (Andreatini et al, 2001; Graeff & Zangrossi Jr., 2010; APA, 2014), indicando que se trata de uma manifestação patológica fisiologicamente diferenciada dos demais transtornos de ansiedade, e que deve ser tratada separadamente dos demais. De acordo, optamos por não tratar especificamente do Transtorno de Pânico no presente trabalho.

da ansiedade, assim como alterações fisiológicas e de sensibilidades, aumentam a probabilidade de o indivíduo detectar cedo e corretamente um estímulo ameaçador, assim como estar preparado para eventual confronto, em relação tanto à atenção quanto à preparação fisiológica. Além disso, também podem reduzir a chance de encontro com uma situação ameaçadora.

### **Tabela 1**

#### *Sintomas da ansiedade e sua função de defesa contra ameaças potenciais*

<b>Sintoma</b>	<b>Função</b>
Facilmente assustado, hipersensibilidade a barulhos	Evocação fácil da resposta à ameaça e detecção de ameaças
Insônia e sono frágil	Estado constante de alerta
Inquietação e aumento de taxa cardíaca	Corpo está em estado preparado para ação (aumento de taxa cardíaca incorre em uma mais rápida oxigenação dos músculos)
Atenção preferencial a dicas relacionadas a ameaças	Ameaças são notadas mais cedo
Interpretação de informação ambígua como ameaçadora	Menor probabilidade de julgar uma ameaça como sendo segura
Aversão a ambiguidade	Evitação de situações potencialmente perigosas/cujo nível de ameaça não é claro ou conhecido

*Nota:* Traduzida e modificada de Bateson et al. 2011 - Anxiety: An Evolutionary Approach

De acordo com essa perspectiva evolutiva, o traço de ansiedade - que pode ser pensado como a predisposição individual para a ansiedade, em oposição a ansiedade situacional, ou de estado, que ocorre quando um indivíduo é colocado em uma situação ansiogênica - seria uma característica em um contínuo na população, distribuída de maneira normal (Bateson et al., 2011), sendo a ansiedade clínica ou patológica um extremo desta distribuição. Ou seja, assim como existem indivíduos com alta predisposição à ansiedade, existiriam também indivíduos com ansiedade "patologicamente" baixa, porém esta condição

não é reconhecida na sociedade como problema uma vez que não causa sofrimento subjetivo.

Bateson et al. (2011) apontam evidências de estudos populacionais para substanciar esta afirmação. Lee et al. (2006) encontraram correlação entre maior ocorrência de mortes acidentais antes dos 25 anos e um menor traço de ansiedade aos 13 e 15 anos de idade, conforme medido a partir de observações de professores e o *score* obtido no inventário de personalidade Maudsley; entretanto, também foi observada correlação entre maior traço de ansiedade e maior mortalidade não-acidental após os 25 anos, relacionada a problemas médicos. Mykletun et al. (2009), por sua vez, observaram que ansiedade como um fator de comorbidade à depressão, avaliada a partir de duas escalas (Depressão e Ansiedade), se correlacionou a menor mortalidade ao longo de um período de 3 a 6 anos, em comparação a indivíduos com depressão sem ansiedade.

Bateson et al. (2011) propõem que a resposta patológica de ansiedade seria, então, nada mais que uma *disfunção* da resposta de ansiedade normal, que faz parte dos comportamentos normais e adaptativos da espécie e que foram selecionados evolutivamente ao longo de sua história evolutiva. As causas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta disfunção - ou seja, a etiologia dos TAs - têm sido intensamente estudadas. Uma série de fatores, ambientais e genéticos, já identificados permitem uma maior compreensão do fenômeno.

### **Etiologia e Manutenção dos Transtornos de Ansiedade**

#### *Ansiedade, estresse e glicocorticoides*

Embora os TAs possuam uma importante carga hereditária - com um terço do risco de se desenvolver transtorno de ansiedade generalizada, por exemplo, sendo de origem genética (APA, 2014) - os genes associados aos TAs não são exclusivos de transtornos específicos, e estão envolvidos na predisposição a diferentes TAs e transtornos de humor, assim como a depressão (APA, 2014). Fatores ambientais, por sua vez, teriam um importante papel em se o indivíduo desenvolverá um transtorno, assim como qual este seria (Martin et al, 2009).

Uma classe de estímulos ambientais que interagem de maneira importante com as predisposições genéticas em relação à ansiedade é a dos estressores, estímulos ambientais imprevisíveis ou incontroláveis que evocam uma série de respostas, fisiológicas e comportamentais, conhecidas como estresse (McEwen & Wingfield, 2003; Koolhas, 2011; Sandi, 2013).

São encontradas diversas associações entre estressores, especialmente os de grande magnitude – que podem também ser chamados de traumas - e os TAs (APA, 2014). Não são surpreendentes, então, as similaridades encontradas entre os TAs e o transtorno de estresse pós-traumático, tanto em etiologia quanto sintomática (APA, 2014, Faravelli et al, 2012). A infância parece ser um período particularmente sensível neste aspecto, e traumas ocorridos durante a infância parecem ter um valor preditivo positivo em relação às chances de o indivíduo desenvolver um TA (Faravelli et al, 2012). Têm sido observado que fêmeas, tanto ratas (Jaric et al, 2019) quanto humanas (Östberg et al, 2015), parecem ser mais sensíveis a estressores durante a infância do que machos, algo que pode estar relacionado à maior prevalência de TAs em mulheres.

O estresse crônico é outro fator que aumenta de maneira significativa o risco de um indivíduo desenvolver um TA (Carvalho, 2007; McEwen & Mirsky, 2007; APA, 2014; Faravelli et al, 2012; Ter Host et al, 2012; Downer e Lowry, 2013). Os mecanismos fisiológicos associados à resposta de estresse, descritos adiante, permitem um melhor entendimento desta relação entre estresse e ansiedade.

Neuroendocrinamente, a resposta de estresse é tipificada principalmente pela ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) e a subsequente liberação de hormônios glicocorticoides - cortisol em humanos, corticosterona em ratos (Graeff, 2007; Bamberg, Palme e Meingassner, 2001). Adicionalmente, o sistema nervoso simpático também é estimulado como parte da reação a estressores agudos, levando à liberação de adrenalina e noradrenalina, de maneira periférica e circulatória (Graeff e Zangrossi Junior 2010).

A flutuação hormonal da resposta de estresse é um componente altamente conservado na história evolutiva dos vertebrados (Marasco et al., 2015). Os glicocorticoides, com especial relevância para a ansiedade, têm ampla ação sobre o organismo, com a função de prepará-lo para desafios, tornando energia disponível para tecidos relevantes por via de glicogênese hepática e inibição da absorção de glicose em tecidos periféricos (Sapolsky et al, 2000), assim como desempenham uma modulação da excitabilidade de redes neurais associadas à aprendizagem e memória (de Kloet et al, 1999).

A resposta de estresse tem função adaptativa, porém pode se tornar desregulada perante estressores de magnitude muito grande ou muito persistentes, se tornando desproporcional ou até ausente (Carvalho, 2007; McEwen & Mirsky, 2007). A longo prazo, podem ser observados efeitos como mudanças nos níveis circulantes de glicocorticoides, queda do sistema imunológico, prejuízos neuronais, em específico ao hipocampo e uma

série de estruturas cerebrais superiores, perdas cognitivas e de memória, e, em casos graves, distúrbios como depressão e TAs (Carvalho, 2007; McEwen & Mirsky, 2007; Bondi, Rodriguez, Gould, Frazer e Morilak, 2008, McEwen e Wingfield, 2003; McEwen e Stellar, 1993).

A relação próxima entre ansiedade e estresse se revela também na sua associação com a resposta de fuga ou luta, e pode ser vista quando um indivíduo é exposto a uma situação ansiogênica aguda - ou seja, uma que sinaliza ameaça vindoura - na reação comportamental, neural e endócrina do indivíduo e sua proximidade com a resposta de estresse (Martin et al, 2009; Graeff and Zangrossi Junior, 2010). De fato, distinguir estresse, medo e ansiedade em condições experimentais é um problema epistemológico e metodológico na área (Steimer, 2011; Liebsch et al, 1998).

Já desde a vida intrauterina, assim como posteriormente durante a amamentação, o desenvolvimento do eixo HPA do indivíduo pode ser influenciado por eventos externos; estudos têm demonstrado que a exposição de gestantes à administração de glicocorticoides e/ou estressores ambientais afetam a futura reatividade endócrina e comportamental de sua prole a estressores (Welberg et al., 2001; Borsch, Krömer e Neumann, 2006; Waffarm e Davis, 2012; Downer e Lowry, 2013). Estas diferenças na atividade do eixo HPA, por sua vez, estão associadas a diferentes perfis comportamentais em uma série de aspectos (Welber et al., 2001; Waffarm e Davis, 2012; Raulo e Dantzer, 2018). Os achados em relação ao funcionamento basal do eixo HPA em indivíduos com TAs, entretanto, são por vezes pouco conclusivos e até contraditórios, possivelmente em função das frequentes comorbidades, como transtorno depressivo maior e pânico (Stedte-Schmiedgen et al, 2017; Vreeburg, 2010), além das variações inerentes a diferentes métodos de amostragem de cortisol (Graeff & Zangrossi Jr., 2010; Stedte-Schmiedgen et al, 2017) e também da duração do transtorno (Hek et al, 2013).

Evidências de mudanças na ação do eixo HPA ao longo da vida de indivíduos com TA têm sido observadas a partir de estudos de dosagem de cortisol (salivar, sanguíneo ou capilar), uma medida indireta do funcionamento do eixo HPA. Em crianças e adolescentes com TAs (Kallen et al, 2008), foram observadas correlações entre o cortisol basal salivar e diferentes aspectos do comportamento ansioso conforme medido por escalas específicas; concentrações menores de cortisol ao acordar estavam associadas, em ambos os sexos, a maior comportamento de evitação de dano e, somente em meninas, altas concentrações neste mesmo horário se relacionaram a baixos níveis de ansiedade. Concentrações de cortisol no horário de meio dia também apresentaram correlação positiva com os escores relacionados a sintomas físicos e ansiedade de separação em crianças (Kallen et al, 2008).

Já em adultos, a dosagem de cortisol capilar não demonstrou diferenças entre indivíduos com transtorno de ansiedade generalizada e sujeitos controle (Steudte-Schmiedgen et al, 2017). Cortisol salivar, entretanto, revelou maior concentração ao acordar para pessoas com ansiedade, porém este efeito foi observado principalmente em indivíduos com comorbidades (Vreeburg, 2010). Em idosos, a análise do cortisol salivar ao acordar revelou concentrações menores em indivíduos com TA do que em sujeitos sem algum TA presente (Hek et al, 2013). Hek et al. (2013) também apontam que a cronicidade do transtorno também pode ser uma variável importante em relação ao efeito de um TA sobre o eixo HPA, postulando um aumento de cortisol durante a fase aguda da doença com uma subsequente redução além do basal uma vez que a condição se torne crônica. Essas evidências indicam que os TAs estão associados à infraregulação do eixo HPA a longo prazo, e que também este é um processo que ocorre e se modifica ao longo da vida do indivíduo e da duração do transtorno (Hek et al, 2013). É interessante notar que diferentes tratamentos farmacológicos para ansiedade também interagem com e modulam partes do eixo HPA, (Tafet e Nemeroff, 2020), reforçando a relevância que o eixo HPA tem nos TAs.

Em animais não humanos, correlações entre a desregularização de eixo HPA e a manifestação de comportamentos ‘tipo ansiedade’<sup>3</sup> também têm sido estabelecidas, em especial por meio do uso de modelos genéticos e comportamentais. Diversos sintomas e diferentes aspectos dos TAs podem ser replicados atualmente através de manipulações ambientais, lesões, fármacos, treinos comportamentais, entre outros (Steimer 2011; Ohl, 2005). Extremos opostos da ansiedade inata - também referida como *traço* de ansiedade - foram obtidos na forma de duas linhagens de ratos Wistar (*rattus Novergicus*), a partir de seleção artificial que resultaram também em perfis distintos de atividade do eixo HPA, (Liebsch et al 1998; Henniger et al 2000). Essas duas linhagens - Low Anxiety-type Behavior (LAB) e High Anxiety-type Behavior (HAB) - foram criadas a partir de animais selecionados por sua resposta no labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus Maze* - EPM). Este teste é composto de um ‘labirinto’, suspenso a uma distância do chão, com quatro braços, dois ‘abertos’, sem paredes, e dois ‘fechados’, que possuem laterais mais altas do que os animais testados conseguiriam alcançar (Liebsch et al., 1998). Em função do medo inato de ratos de áreas abertas, expostas e elevadas (Liebsch et al, 1998), este teste apresenta um conflito entre a preferência por um local protegido (os braços ‘fechados’) e a neofilia típica desses animais, expressa no comportamento de explorar os braços abertos (Liebsch et al, 1998). Animais que apresentam maior tempo de teste passado nos braços abertos, assim como maior distância percorrida durante o teste, maior número de entradas nos braços ‘abertos’ e menor latência para a primeira entrada nos braços abertos, são

<sup>3</sup> terminologia utilizada para se referir a uma série de alterações comportamentais - liberação de glicocorticoides, atenção aumentada, evitação de lugares novos e perigosos, redução na exploração e alimentação, aumento da taxa cardíaca - que ocorrem em animais não humanos que parecem ser homologas à ansiedade humana (Bateson et al, 2011).

classificados como tendo “baixo comportamento tipo ansiedade” (Liebsch et al, 1998), enquanto os apostos são classificados como “alto comportamento tipo ansiedade”. Os extremos de ambos perfis foram cruzados entre si. As linhagens resultantes foram então cruzadas com outras duas linhagens distintas quanto ao comportamento de *freezing* em reação a testes de sobressalto - animais com alta taxa de *freezing* foram cruzados com a linhagem ‘tipo ansiosa’, e os animais com baixa taxa de *freezing* com aqueles que apresentava ‘baixo comportamento tipo ansioso’ (Liebsch et al. 1998).

Essa seleção e inter cruzamentos resultaram em dois perfis de funcionamento do eixo HPA, em relação à resposta de corticosterona a estressores, e de desempenhos diferentes em testes de ansiedade (Liebsch et al 1998; Henniger et al 2000), fenômeno observado de maneira conservada mesmo em diferentes laboratórios (Salomé et al, 2002), após *cross-fostering* de filhotes (Wigger et al, 2001), e através dos sexos (Liebsch et al 1998; Henniger et al 2000). Animais LAB apresentam, de maneira geral, menor reatividade a estressores e menos comportamento tipo ansioso do que animais HAB, de acordo com testes clássicos para caracterização da ansiedade. Além das diferenças descritas no EPM (Liebsch et al, 1998; Henniger et al, 2000; Salomé et al, 2002), os distintos perfis quanto ao comportamento tipo ansiedade também foram observados em outros testes, como o campo aberto (*Open Field* – OF) (Liebsch et al, 1998; Salomé et al, 2002), caixa claro-escuro (Henniger et al, 2000) e nado forçado (Liebsch et al, 1998). O teste de OF se baseia nos mesmos pressupostos que o EPM para classificar o comportamento de animais em menos ou mais ansioso (Liebsch et al, 1998; Salomé et al, 2002); nele, animais são colocados em uma caixa experimental com paredes altas e opacas, e a distribuição do tempo que é passado na porção central da caixa, em contraste com nas áreas adjacentes às paredes, é analisada, assim como a distância caminhada, total e em cada área. Foi observado que animais HAB apresentam menor locomoção total, assim como menos tempo passado nas áreas centrais do que animais LAB (Liebsch et al, 1998; Salomé et al, 2002). De maneira similar, no teste de caixa claro-escuro - no qual o animal é colocado em uma caixa com dois compartimentos, um pintado de preto opaco e com baixa luz, e outro branco e com luz mais intensa, e o tempo passado em cada compartimento, assim como a latência para entrar no iluminado e o número de entradas e distância percorrida – a linhagem HAB apresentou perfil comportamental do tipo considerado ansioso, enquanto animais LAB obtiveram scores consistentemente menores nas medidas de ansiedade (Liebsch et al, 1998; Salomé et al, 2002). Por final, essas diferenças também foram registradas no teste de nado forçado, no qual o animal é colocado em um cilindro cheio de água e sem nenhum local onde ele possa se apoiar, e então tem a estratégia comportamental – boiar, se debater ou nadar – registrada, assim como a duração de cada comportamento e a latência até o flutuar

(Liebsch et al, 1998). Animais HAB apresentaram o que é chamado de “*coping* passivo”, com uma maior rapidez e tendência para o boiar, indicando que as linhagens também apresentam perfis comportamentais de reação a estressores diferentes (Liebsch et al, 1998). É importante notar que animais machos e fêmeas apresentaram perfis similares em ambas as linhagens (Liebsch et al 1998; Henniger et al 2000).

Adicionalmente, os níveis de corticosterona basal circulante em HAB e LAB são similares, porém ao serem expostos a um estressor, HABs apresentam um aumento significativamente maior na secreção de corticosterona (CORT) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) do que os animais LAB (Landgraf et al., 1999). Um último ponto de interesse é que apesar de diferenças em locomoção terem sido observadas entre os animais, análises detalhadas repetidamente demonstraram que essa diferença é secundária à ansiedade, e não o fator determinante do desempenho dos sujeitos de diferentes linhagens (Henniger et al, 2000).

A linhagens HAB e LAB são considerados um modelo de extremos de ansiedade inata (Liebsch et al 1998; Henniger et al 2000, Salomé et al, 2002) com considerável validade, uma vez que o componente hereditário, presença em ambos sexos e reatividade diferenciada a estressores se assemelham ao observado em humanos (Landgraf & Wigger, 2002; Salome, 2002). O uso destes animais em investigações sobre a ansiedade tem o benefício de permitir o estudo desse aspecto inato (a chamada ansiedade de traço), além não necessitar o uso de estressores ostensivos ou algum outro protocolo comportamental para gerar este perfil ansioso, algo que é notado como positivo por autores que estudam ansiedade (Donner e Lowry, 2013; Campos et al, 2013). Este modelo animal foi, portanto, escolhido para o desenvolvimento da presente pesquisa.

#### *Ansiedade em fêmeas*

Outro fator que parece mediar de maneira significativa o desenvolvimento de TAs é o sexo do indivíduo. Levantamentos populacionais e epidemiológicos revelam uma propensão duas vezes maior para mulheres de desenvolver um TA, variando de acordo com o transtorno específico (APA, 2014). Foi observado que mesmo em uma população normalmente distribuída, garotas entre 15 e 18 anos já apresentam mais pensamentos e crenças classificadas como “ansiosas” do que garotos da mesma idade, diferindo especialmente quanto à valoração da preocupação e também numa maior crença na impossibilidade de se controlar a preocupação e ansiedade (Bahrami e Yousefi, 2011). Embora não seja possível desconsiderar que pressões ambientais diferentes em homens e mulheres tenham parte nessa diferença (Rubinow e Schmidt, 2019), estudos pré-clínicos

revelam uma série de mecanismos fisiológicos que estão associados à maior resposta a estressores em fêmeas, em níveis endócrinos, emocional e de excitabilidade, e que possivelmente estão implicados na maior vulnerabilidade para transtornos relacionados ao estresse tais quais os TAs na população humana feminina (cf. Bangasser e Valentino, 2014; Rubinow e Schmidt, 2019). Entre tais mecanismos estão a resposta aumentada a estressores em fêmeas de roedores (ter Horst, 2013) e a regulação positiva por estrógenos do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) - que estimula a liberação de ACTH pelo pituitária, estimulando, assim, a síntese e liberação de cortisol (Vamvakopoulos e Chrousos, 1993).

Interações entre estressores, esteróides reprodutivos e o comportamento ansioso também têm sido observadas. O estrogênio, especificamente, pode ser pensado como um modulador da resposta neuroendócrina de estresse (Figueiredo et al, 2006). Foi encontrado, em ratas, que a secreção basal de ACTH e CORT atingiu seu pico sérico durante a fase do pro-estro, após o pico de estrogênio e próximo ao pico de progesterona (Buckingham, Döhler e Wilson, 1978; Paccola et al, 2013). Entretanto, o pro-estro e estro são as fases estrais durante as quais ratas apresentam menor taxa de comportamento ansioso e reatividade a estressores (D'sousa e Sadananda, 2017, ter Horst, 2012), pelo menos parcialmente devido à funções moduladores dos estrógenos e progesterona (Mora, Dussaubat e Díaz-Véliz, 1996; Jaric et al, 2019; ter Horst, 2012). Durante o diestro - fase caracterizada pela queda em progesterona circulante e taxas baixas, porém constantes de estrogênio - entretanto, o contrário ocorre, e é observada uma maior sensibilidade a estressores e comportamentos relacionados à ansiedade (Lovick, 2011).

Um efeito diferencial a longo prazo de estressores sobre o comportamento de machos e fêmeas também foi encontrado (Jaric et al, 2019). Exposição a um estressor agudo durante a infância aumentou a presença de fenótipo ansioso em fêmeas quando adultas, enquanto subsequente exposição a uma condição estressora crônica leve (isolamento social) durante a adolescência atenuou-o em alguns casos. Esse efeito se mostrou presente especialmente em fases do ciclo reprodutivo com altos níveis circulantes de estrogênio. Independente da presença ou não de estressores prévios, fêmeas com altos níveis de estrogênio consistentemente apresentaram menores índices de ansiedade - conforme medido por teste de campo aberto, labirinto em cruz elevado e teste de nado forçado - do que fêmeas em fases com baixo estrogênio circulante. Os autores postulam que a presença de estresse durante a infância removeria o efeito protetivo causado pelo aumento na concentração de estrógenos circulantes, deixando fêmeas vulneráveis ao efeito ansiogênico da baixa na concentração de estrógenos. É interessante notar que redução nos

scores de ansiedade durante o período de pós-parto e lactação foi observada em humanas e roedores (Donner e Lowry, 2013), apesar da baixa hormonal nestes períodos; outros mecanismos parecem estar envolvidos além dos relativos ao estrogênio nesse fenômeno.

#### *Uma análise funcional do comportamento ansioso*

Além dos aspectos fisiológicos da predisposição à ansiedade, assim como da resposta de ansiedade, a relação do indivíduo com TA com o ambiente, e as contingências vigentes neste, também são parte importante do estabelecimento e manutenção dos TAs (Zamignani e Banaco, 2005).

Uma análise funcional dos TAs, de acordo com uma perspectiva analítico-comportamental, permite um entendimento mais aprofundado da ontogênese desses transtornos, principalmente em relação à manutenção deles em uma condição patológica crônica. Zamignani e Banaco (2005) elencam uma série de comportamentos típicos da ansiedade e suas funções, além dos tipos de relações estímulo-resposta e estímulo-estímulo envolvidos na manutenção da mesma. Em primeiro lugar, a interpretação clássica comportamental da ansiedade se dá pela esquiva (evitação) e fuga (eliminação) de estímulos aversivos ansiogênicos, e comportamentos com essas funções seriam mantidos por reforço negativo. A transformação de respostas reflexas - como ocorrem com uma criança exposta pela primeira vez a um estímulo aversivo específico - em operantes, que ocorreria uma vez que algum aspecto dessas respostas produza uma consequência reforçadora, também é apontada como um aspecto importante da instauração de comportamentos ansiosos. Também deve ser apontada a importância de relações discriminativas e condicionadas que podem ser estabelecidas durante situações que evocam respostas de ansiedade, seja de maneira operante ou respondente. A dificuldade em extinguir o comportamento ansioso patológico reside em parte da generalização de condições e contextos, que podem adquirir controle sobre o comportamento ansioso em partes ou em sua totalidade. A possibilidade de certos aspectos do comportamento ansioso (por exemplo, excesso de prudência, atenção alta a detalhes e erros) poderem ser reforçados pelo ambiente e sociedade no qual o indivíduo está inserido, também é levantada como um mecanismo de manutenção da ansiedade.

É importante notar que as consequências comportamentais dessas contingências, como, por exemplo, um repertório empobrecido, com menor variabilidade (Zamignani e Banaco, 2005), se unem a uma série de impedimentos funcionais relacionados à ansiedade que afetam a cognição do indivíduo, assim como a interação do mesmo com o ambiente (Pigott, 2003).

## **Ansiedade e cognição**

Levando-se em consideração a complexidade e pervasividade da ansiedade, não é surpreendente que esta tenha importante impacto sobre uma série de processos e mecanismos pelos quais informação oriunda do ambiente é processada pelo organismo, os quais estamos referindo *grosso modo* como “cognição” (Shettleworth, 2010). Estudos sobre a ansiedade como fator de impacto sobre a cognição têm estudado a apresentação patológica nos TAs, mas também o papel da ansiedade de estado relacionada a situações específicas (e.g.: testes, avaliação acadêmica, fala em público) e de perfis variados quanto à ansiedade de traço, comparando indivíduos em diferentes pontos da curva quanto a este fenótipo.

Em seguida, iremos descrever alguns mecanismo e processos comportamentais afetados pela ansiedade e de especial relevância para este trabalho, em função de seu envolvimento no comportamento de resolver problemas. Estarão separados em sessões didáticas, embora haja sobreposição entre estes processos, uma vez que todos estão envolvidos no comportamento do organismo.

**Atenção e controle inibitório.** A atenção está diretamente relacionada ao controle do comportamento por estímulos ambientais (Shahan, 2013). Fala-se do comportamento de atentar quando um ou mais dado estímulo controla as respostas perceptuais do indivíduo, como visão e audição. Em contrapartida, a atenção também envolve o não atentar a estímulos, quando estes não são relevantes para a contingência em questão. Já o termo ‘controle inibitório’ será usado aqui para descrever a redução na probabilidade de uma dada resposta em função de mudanças contingenciais (Hallion et al., 2017). Essa mudança nas contingências pode ser sinalizada, acompanhada de mudanças ambientais, ou não. É importante notar que a inibição comportamental aqui discutida não se trata de uma resposta ativa por parte do indivíduo, e sim um processo pelo qual a probabilidade de certos comportamentos possíveis em dado momento é reduzida.

Nos TAs, têm sido observado que essa redução contextual de um comportamento de alta probabilidade é afetada. Adultos com e sem transtorno de ansiedade generalizada responderam a um teste Stroop e um teste no/no-go, tarefas nas quais a inibição de respostas é um fator de primeira importância para o desempenho (Hallion et al, 2017). O diagnóstico de TA - conforme medida por presença de diagnóstico e avaliação clínica - esteve negativamente correlacionado com o desempenho no Stroop, porém não com o desempenho na tarefa de no/no-go. Hallion et al (2017) colocam que essa diferença pode se dar ao tipo específico de inibição envolvida em cada tarefa; enquanto o teste Stroop

requer a inibição de uma resposta de maior probabilidade (a palavra escrita) por uma de menor probabilidade (a cor das letras), enquanto o teste de go/no-go requer que só seja dada resposta em tentativas que apresentam a relação correta (quando eram apresentados quadrados de cor que não vermelho)<sup>4</sup>. De acordo, as duas tarefas conhecidamente recrutam áreas corticais diferentes durante sua execução (Hallion et al, 2017), indicando envolverem diferentes processos. Em uma leitura analítico comportamental, podemos observar o mesmo; pode ser dito que a enquanto a tarefa Stroop envolve dois comportamentos discriminados concorrentes já estabelecidos, um dos quais é altamente provável e entra em extinção em função das contingências ambientais da situação de teste (no caso, o responder a partir da palavra escrita), na tarefa de go/no go, não há essa concorrência de respostas e sim um processo de aprendizagem de uma nova discriminação (no caso, responder no bloco vermelho resulta em erro). Dessa maneira, os dados de Hallion et al. 2017 indicam que a discriminação simples não é o processo que está afetado pelos TAs.

Um estudo similar de Grillon et al. (2017), por sua vez, empregou adultos com e sem ansiedade generalizada e os submeteu a uma tarefa go/no-go dividida entre blocos seguros e não seguros sinalizados. Durante os blocos não seguros, havia a possibilidade de o sujeito receber choques não contingentes ao seu comportamento e nos seguros apenas a contingência de reforço estava presente. Nesta situação, foi observado que tanto a ansiedade clínica quanto de estado - medida por resposta de sobressalto a tons emitidos regularmente - esteve correlacionada com pior desempenho em ambas as tarefas. Especificamente, houve maior quantidade de erros do tipo “não responder” nos blocos não seguros para ambos os grupos, e em ambas as condições para o grupo ansioso. Os autores interpretaram esses resultados em termos de uma maior inibição comportamental causada tanto por ansiedade patológica quanto situacional. Tomados juntos, então, estes estudos indicam que indivíduos com TA apresentam persistência maior de comportamentos já estabelecidos, mas que o contexto emocional discriminado da situação de teste (e.g. segura, ameaçadora, triste etc.) pode ter um efeito contrário, de supressão generalizada do responder. Esse perfil comportamental por vezes é chamado de inibição comportamental (Svihra e Katzman, 2004), e incorre na redução no responder em situações desconhecidas, assim como aumento de respostas fisiológicas associados à ansiedade.

<sup>4</sup> No teste Stroop, o sujeito é apresentado com palavras com significado de cores (azul, amarelo, etc.), coloridas de maneira divergente (ou seja, a palavra ‘azul’ pode ser apresentada em letras vermelhas) e o indivíduo deve nomear a cor das letras apresentadas, e não da palavra. Já no teste go no-go, o indivíduo é apresentado com duas condições, umas na qual deve pressionar um botão, e outra na qual não deve fazer nada.

### **Memória de trabalho e desempenho em tarefas de alta demanda cognitiva.**

Embora os diferentes tipos de ansiedade impactem a mais variada sorte de tarefas, testes ditos complexos ou de alta dificuldade (e.g.: desenvolvimento de tarefas concorrentes; solução de problemas enquanto expostos a distratores) parecem ser particularmente afetados (Eysenck et al, 2007). Ainda nesta linha, a memória de trabalho - ou seja, a quantidade de informações com as quais um indivíduo consegue lidar em determinado momento - foi repetidamente apontada como um fator determinante no prejuízo de desempenho observado em indivíduos ansiosos.

Para explicar prejuízos observados, muitas vezes a ansiedade é considerada como uma espécie de comportamento concorrente que 'consome' parte da atenção e memória de trabalho do indivíduo, levando à redução na eficácia e efetividade do comportamento, mesmo que por vezes o resultado final seja similar ao de indivíduos não acometidos por TAs (Sarason, 1990; Eysenck et al, 2007; Derakshan e Eysenck, 2009). Ou seja, indivíduos ansiosos demorariam mais tempo para concluir tarefas complexas, porém com número similar de erros. Embora essa explicação dê conta de uma série de previsões em relação ao impacto da ansiedade em uma determinada tarefa, estudos específicos encontraram que essa relação é mais complexa.

Lukasik et al. (2019) encontraram uma correlação negativa entre ansiedade - medida por um questionário de ansiedade de estado e traço - e a memória de trabalho em tarefas verbais e viso-espaciais, assim como em uma tarefa de n-back<sup>5</sup>. Essa mesma relação não foi encontrada entre estresse diário auto-reportado e desempenho. Owens et al. (2014) por sua vez, encontraram que a intensidade da demanda cognitiva da tarefa também parece ter um papel significativo. Adolescentes de 12 a 14 anos responderam a questionários para estabelecer o seu nível de ansiedade, assim como completaram tarefas dependentes da memória de trabalho verbal e espacial (AwMA e CANTAB). Foram, então, submetidas a testes cognitivos - as matrizes progressivas de Raven e o teste de computação matemática do WRAT 4 - e seu desempenho nestes contabilizado. Os escores tanto de ansiedade quanto de memória de trabalho não apresentaram correlação com o desempenho nos testes cognitivos na amostra em geral, nem nas subpopulações com ansiedade ou memória de trabalho médias. Para indivíduos com ansiedade e escore de memória de trabalho nos extremos, entretanto, foi observada uma relação de mediação entre a ansiedade e a memória de trabalho, e o desempenho nos testes cognitivos. As medidas de ansiedade tiveram correlação inversa com o desempenho em indivíduos com baixo escore de memória

<sup>5</sup> Em uma tarefa de n-back, o indivíduo é apresentado uma série de estímulos em sequência, e deve indicar qual foi o estímulo apresentado anteriormente na posição indicada (ou seja, em uma tarefa de 1-back, o indivíduo deve indicar o estímulo que foi apresentado antes do último, enquanto em uma tarefa 3-back, seria um estímulo que havia sido apresentado 3 posições antes).

de trabalho, enquanto para aqueles com alto escore de memória de trabalho, a correlação foi positiva (Owens et al, 2014).

Esses achados se alinham com o observado por Vytal et al. (2012); trinta e um adultos foram treinados em uma tarefa de n-back utilizando letras, na qual o indivíduo deveria responder “igual” quando o estímulo apresentado era o mesmo da condição e “diferente” quando este não era. Durante a sessão de teste, os indivíduos também estavam colocados em duas condições alternadas, segura (sem chance de choque) e não segura (chance de receber um choque não contingente) enquanto respondiam a testes de n-back com diferente carga cognitiva (ou seja, n maior ou menor). Ao total, doze choques foram administrados por sessão. Sondas para a mensuração de sobressalto também foram apresentadas, nove ao total, sendo a sonda a apresentação de um som por meio de fones de ouvido. Os blocos foram contra-balanceados para a apresentação de todos os estímulos. Ao final da sessão, os indivíduos preencheram um questionário em escala likert relatando seu nível de distração e ansiedade durante as diferentes condições.

Os autores encontraram uma relação dinâmica e internacionalmente proporcional entre a intensidade da carga cognitiva da tarefa e a ansiedade; isso é, em condições de teste mais fáceis, o contexto ansiogênico da possibilidade de choque teve um impacto maior sobre o desempenho e memória de trabalho, enquanto em condições de maior carga cognitiva, o mesmo não foi observado. Foi relatada menor ansiedade durante os blocos ‘seguros’, e uma correlação negativa entre a redução da reatividade de sobressalto entre tarefas de médio e alto impacto cognitivo (2-back e 3 back) e o impacto observado durante as tarefas de alta demanda cognitiva durante blocos de ‘ameaça’. Ou seja, em indivíduos que apresentaram redução na sensibilidade à sobressalto com o aumento de carga cognitiva também houve menor impacto do aumento da demanda cognitiva sobre o desempenho. Tomando esses resultados juntos, os autores postulam que existe um ponto de virada no qual, em função da alta demanda cognitiva, há prioridade do comportamento de responder sobre o comportamento ansioso, reduzindo a interferência desta sobre o desempenho.

Uma investigação do desempenho de indivíduos com TAs na escola e trabalho indica que esses prejuízos cognitivos têm um grande impacto nestas áreas. A ansiedade está associada ao desempenho escolar prejudicado, ao ponto que um levantamento populacional encontrou que a presença de ansiedade era o maior preditor de abandono escolar por mulheres (Pigott, 2003). Adicionalmente, foram encontrados que alguns TAs, como o transtorno de ansiedade generalizada, estão associados a pior desempenho no local de trabalho (Greenber et al, 1999).

Um fenômeno clássico na qual a interação entre ansiedade e alta demanda cognitiva é particularmente clara se trata da chamada ansiedade de teste. Angelidis et al. (2019) investigaram esse fenômeno; sessenta e oito mulheres foram divididas entre em grupo estresse e controle, tiveram seu traço de ansiedade de teste mensurado, e foram expostas a duas tarefas de n-back (n-back 2 e n-back 3). Palavras neutras (e.g.: episódio, frequência), negativas (e.g.: falha, vergonha, erro) e nenhuma palavra poderia estar presente junto do estímulo apresentado durante as tarefas. Para a tarefa de maior carga (n-back 3), foi encontrada um efeito moderador da ansiedade no efeito das palavras negativas no desempenho - indivíduos com maior ansiedade de teste, mas não de traço, apresentaram respostas mais lentas e menos precisas quando palavras negativas estavam presentes. Estes achados fortalecem a importância do contexto emocional para que seja determinado o efeito que a ansiedade terá sobre o desempenho.

**Flexibilidade Comportamental.** A flexibilidade comportamental, conforme será tratada neste presente trabalho, se trata de nada mais do que a adaptação do comportamento de um organismo de acordo com mudanças no ambiente e contingências. O estresse é um conhecido fator modulador da flexibilidade, com efeito deletério em tarefas como formação de anagramas e o CRA (Alexander et al., 2007). De maneira similar, a falta de flexibilidade comportamental observada nos TAs resulta em persistência em estratégias conhecidas que não mais estão de acordo com as contingências vigentes (Park e Moghaddam, 2017). Diferentemente do controle inibitório, quando falamos de flexibilidade comportamental, também está inclusa a emissão de novos comportamentos de acordo com o novo ambiente, e não somente a redução de um comportamento previamente estabelecido, embora esta redução de probabilidade de comportamentos altamente prováveis também seja necessária que o comportamento mude.

Evidência deste comprometimento da flexibilidade comportamental em indivíduos ansiosos pode ser encontrado no estudo de Wilson et al. (2018). Cento e cinquenta e quatro indivíduos foram classificados quanto a sua ansiedade de traço e então submetidos a um teste go/no-go e um jogo de apostas no qual deveriam escolher entre dois decks de carta com probabilidades diferentes de resultar em ganhos (Wilson et al, 2018). Em ambas as tarefas foi observado um prejuízo no desempenho do grupo alta ansiedade, que apresentou mais escolhas incorretas e persistência em respostas anteriores. Essa característica inflexível do comportamento está de acordo com a função evolutiva da ansiedade - de reduzir a exposição do indivíduo a situações novas e potencialmente prejudiciais ao inibir comportamentos novos - porém pode ser desadaptada quando o indivíduo se encontra em uma nova situação.

De acordo com esses achados em relação à flexibilidade, não seria de surpreender que a ansiedade também impacte a chamada “criatividade”. Byron e Khazanchi (2011) definem um comportamento como criativo quando há a produção de respostas ou produtos que, naquele contexto, são ambas inovadoras e funcionais (úteis). Ou seja, para que haja comportamento criativo, é necessário que o comportamento do organismo se distancie de estratégias já estabelecidas. Será esta definição utilizada no presente trabalho.

Em meta análise, Byron e Khazanchi (2011) apontam que a criatividade e a ansiedade parecem representar demandas conflitantes do organismo, e estariam negativamente correlacionadas. Isto vai contra a percepção popular de que haveria uma correlação positiva entre doenças mentais e a criatividade (Nogueira e Fleith, 2019). Já Silvia e Kimbrel (2010), por sua vez, mediram a ansiedade de 189 indivíduos por meio de escalas (*Social Interaction Anxiety Scale* e *Depression and Anxiety Stress Scale*) e observaram o desempenho deles em uma série de tarefas e escalas escolhidas por medirem diferentes aspectos da criatividade (e.g.: testes de pensamento divergente, escalas de auto avaliação quando à criatividade etc.). Os autores encontram que as medidas de ansiedade possuíam pouco ou nenhum poder preditivo em relação à criatividade.

Poucos estudos básicos, entretanto, com controle mais rígido de variáveis do que permitido em estudos com humanos, foram conduzidos em relação à interação entre ansiedade e criatividade. O uso de modelos animais de ansiedade permite este tipo de investigação detalhada. E em se tratando do estudo da criatividade em animais, a área de resolução de problemas em especial desenvolveu protocolos de interesse que permitem tal investigação.

### **Cavar & Escalar - recombinação de cadeias comportamentais e resolução de problemas**

Uma série de situações problemas têm sido desenvolvidas para que diferentes tipos de resolução de problemas, assim como diferentes aspectos delas, possam ser estudados dentro do laboratório, com animais humanos e não humanos. Para Skinner (1966), uma situação problema necessita de duas condições básicas - a presença de um estímulo reforçador, e que o animal não possua em seu repertório a resposta necessária - a solução - para obtê-lo. Ou seja, para que algo seja considerado um problema da perspectiva do sujeito - e não do experimentador ou de quem tenha organizado as contingências na qual o sujeito se encontra - é necessário que a consequência pela resolução, ou “objetivo”, seja algo que possui valor reforçador para o indivíduo. Adicionalmente, é necessário que o

comportamento específico de solução - ou seja, aquele que gera acesso à consequência - seja algo que não ocorreu, ou não foi emitido, na história daquele sujeito. Ou seja, esse comportamento deve ser novo; a forma como a solução é aprendida, por sua vez, pode variar consideravelmente.

A geração de comportamento novo é uma área de intenso estudo na análise do comportamento. Uma série de modelos e processos envolvidos no surgimento de respostas novas têm sido descritos como, por exemplo, a variabilidade comportamental e equivalência. Este tipo de respostas - que ocorrem sem ser diretamente treinadas, a partir de relações - são também descritas como comportamentos ou respostas emergentes. Neves filho (2018) fala do comportamento emergente como “o efeito do condicionamento operante para além da resposta treinada” (Neves Filho, 2018, p.198), sendo uma resposta que emerge a partir de relações além do expressamente treinado, dando generalização e formação de conceitos como exemplos desse processo.

Se tratando de animais, a chamada "resolução por insight" ou "interconexão de repertórios" (IR - Epstein, 1985) atraiu e atrai especial atenção devido à sua natureza emergente, fluída e direcionada, na qual a solução ocorre de maneira binária (ausente ou presente, sem gradação), ou com um "salto de aprendizagem" (Neves Filho, 2018). A resolução, na IR, é função da aprendizagem de chamados "comportamentos pré-requisito" (PR) - diferentes cadeias comportamentais que compõem a resposta de solução, porém que são aprendidos em contextos diferentes da situação problema. É importante ressaltar que a simples emissão dos PR da mesma forma que foram ensinados não é suficiente para resolver a situação problema.

Epstein (1985) também postulou que um componente vital para a ocorrência desse tipo de resolução seria um controle discriminativo múltiplo na sessão de teste, originado pela presença de dois contextos de treino unidos em uma só situação teste. No processo descrito por Epstein (1985) e chamado de Generalização Funcional, um PR passa a ser controlado pelo estímulo associado a outro PR, em virtude da similaridade de função (obter o reforçador) de ambas as respostas. Assim, a generalização funcional parece se referir à transferência do controle discriminativo de um estímulo ambiental para outro, fisicamente dissimilar, e que isso ocorreria sem treino prévio, de maneira emergente (Shettleworth, 2012). Juntamente com extinção, ressurgência e o encadeamento automático, esses processos seriam responsáveis pela emergência do novo comportamento, ou resposta de solução.

A IR é um processo (Neves Filho e Carvalho Neto, 2013) que foi demonstrado em diversas espécies, como ratos (Delage, 2006; Dicezare, 2017), pombos (Neves Filho et al, 2019), macacos (Neves Filho et al, 2016), corvos (Neves Filho, Knaus e Taylor, 2019), humanos (Pêsoa et al, 2019), entre outros, e também com uma variedade de metodologias e situações problema. De especial interesse para o presente estudo está a tarefa “Cavar e Escalar”, proposta por Neves Filho et al (2015), uma tarefa de recombinação de repertórios ecologicamente relevantes, considerando características fisiológicas e comportamentais de ratos albinos. Especificamente, a tarefa consistia em cavar maravalha para acessar um buraco em uma parede de acrílico, atravessar para o outro lado e então subir dois lances de escada para acessar o alimento <sup>6</sup>. Foram treinados os repertórios de (A) cavar para obter alimento enterrado sob maravalha e (B) escalar uma escada com dois lances e duas plataformas para obter o alimento. Seis animais receberam treino: dois receberam treino de ambas as habilidades, dois somente de cavar e dois somente de escalar. Somente os animais que receberam treino de ambas as habilidades resolveram a tarefa; adicionalmente, a topografia observada foi similar à descrita por Epstein et al. (1984). Os demais animais receberam treino da habilidade faltante após o teste; de quatro, somente um apresentou solução do problema, porém em topografia distinta, com interrupções na sequência comportamental, em uma performance mais similar à considerada como “tentativa e erro”.

Outros efeitos de manipulações na ordem do treino foram observados na tarefa de cavar e escalar – os PRs foram ensinados para diferentes grupos de forma concomitante (sessões de ambos repertórios no mesmo dia), sucessiva (primeiro um repertório é instaurado, e só então é iniciado o treino do outro) ou sucessiva com retomada (igual à sucessiva, porém com um re- treino breve do primeiro repertório ao final do treino), e foi encontrado que o treino concomitante parece favorecer mais a emissão da solução em topografia típica de insight (Neves Filho et al, 2016).

Ainda em relação ao treino, além da possibilidade de sessões de ambas PRs em um mesmo dia, esta tarefa tem o benefício metodológico de necessitar de poucas sessões de treino para a instauração das PRs, reduzindo assim a duração total do experimento. De acordo, treino excessivo e por demais rígido pode resultar em “rigidez funcional” (Duncker, 1945), situação na qual o animal persiste no comportamento aprendido e não o adequa a mudanças ambientais e de contingência, e que impediria a ocorrência de resoluções súbitas (Davis, 1966; Davis, 1973; Newell, 1985). De fato, o mesmo foi observado em Neves Filho et al. (2016), no qual o treino excessivo e rígido de um comportamento impediu que macacos-prego (*Sapajus spp*) atingissem a resolução satisfatória de um problema no qual

<sup>6</sup> conferir Figura 1 para design da caixa experimental de Neves filho et al. (2015)

deveriam unir duas partes de uma ferramenta e em sequência usá-la para pescar um recipiente com alimento.

### **Objetivo e Justificativa**

O presente trabalho buscou investigar o efeito da ansiedade de traço, assim como de manipulações comportamentais e da corticosterona, sobre a IR. Uma vez que a ansiedade tem uma apresentação neuroendócrina distinta em machos e fêmeas, além de uma incidência muito maior em fêmeas, optou-se por utilizar animais do sexo feminino. Fêmeas das linhagens HAB e LAB, utilizadas como modelos animais de extremos na ansiedade inata, foram submetidas a um protocolo de cavar e escalar modificado baseado em Neves Filho et al. (2015). Dessa maneira, a presente tese teve objetivos primários de: 1) caracterizar o desempenho das fêmeas de linhagens HAB e LAB no teste de cavar e escalar; 2) buscar determinantes ambientais das diferenças encontradas, e 3) investigar associações entre níveis séricos de corticosterona e a IR.

Para tal, foram feitos quatro experimentos. Primeiramente (1), ratas HAB e LAB receberam três níveis de treino (Sem Treino, Incompleto e Completo) dos PRs Cavar e Escalar, e então foram submetidos à condição de teste e as diferenças no desempenho entre linhagens foram registradas. Em seguida, foram feitas modificações ao treino baseadas no desempenho observado no experimento anterior, visando garantir que as diferenças observadas não fossem oriundas de problemas metodológicos no treino das PRs. Para tal, (2) o treino das PR foi alterado para reduzir sua aversividade para os animais HAB, com o PR cavar, em especial, recebendo um treino mais minucioso, uma vez que foi observada baixa ocorrência deste repertório nos animais HAB durante a situação de teste.

Em seguida, (3) o papel dos glicocorticoides durante o momento de solução foi investigado. Animais HAB, LAB e NAB (animais de tipologia não selecionada especificamente em relação à ansiedade) receberam injeções de corticosterona (10 mg/kg), metirapona (50mg/kg) (uma droga que suprime a produção de corticosterona) ou veículo. Animais LAB não foram tratados com metirapona, em função da baixa disponibilidade de animais. Estas manipulações tiveram por objetivo investigar o papel do aumento e redução de glicocorticoides circulantes sobre a IR, e se estes são o fator determinante do desempenho das ratas de diferentes linhagens.

Por último, (4) a exposição dos animais HAB à situação de teste foi repetida diversas vezes, buscando uma habituação a eventuais aspectos aversivos da condição. Isso foi feito <sup>7</sup>Devido à disponibilidade limitada de animais LAB, e à similaridade do desempenho de animais LAB e NAB, não pode ser feito um grupo de tratamento com metirapona e ratas LAB. Uma vez que estes animais apresentam baixos níveis de corticosterona normalmente, foi determinada prioridade para a alocação destes animais no grupos CORT.

para garantir que o fator determinante no desempenho dos animais HAB durante o teste não fosse uma eventual neofobia em função do novo ambiente.

Secundário a estes objetivos primários, também se teve meta de caracterizar o controle de estímulos presente na tarefa utilizada. Especificamente, buscamos verificar a transferência de controle (ou 'generalização funcional') sobre o comportamento de cavar para o estímulo "escada" presente em C2, similar à transferência proposta por Epstein et al. (1985). Para tal, a distribuição do comportamento de cavar foi quantificada quanto à sua posição na caixa de teste em relação à escada. Também foi analisada se houve relação entre o aparente controle da escada sobre o comportamento e a ocorrência de solução. Estas relações foram analisadas e contrastadas para todos os grupos e linhagens utilizadas, permitindo que um padrão comportamental geral de solução em relação ao controle espacial das respostas fosse descrito.

Nossa investigação se justifica em dois principais eixos: o peso dos prejuízos individuais e sociais dos TA, dos quais déficits comportamentais e cognitivos fazem parte, e a relevância da criatividade e processos comportamentais como a IR para a vida pessoal, acadêmica e profissional do indivíduo. Uma melhor compreensão de como esses fatores interagem pode levar a avanços importantes em como remediar o déficit cognitivo de indivíduos que sofrem de TAs e ansiedade não patológica.

## EXPERIMENTO 1

### Estabelecendo o protocolo e diferenças entre linhagens

#### OBJETIVO

O objetivo principal deste experimento foi observar o desempenho de linhagens HAB e LAB na tarefa Cavar e Escalar, assim como averiguar a interação entre linhagem e qualidade de treino. Teve como objetivo secundário avaliar a adequação do novo equipamento, uma vez que foram realizadas modificações importantes ao modelo de caixa experimental usado por Neves filho et. al. (2015).

Para tal, ratas de linhagem LAB e HAB foram divididas em três grupos cada, que receberam diferentes qualidades de treino (Sem Treino, Incompleto e Completo). Foi esperado que animais que receberam o treino completo atingiriam a solução da situação problema com maior frequência do que os animais dos demais grupos, demonstrando que a ocorrência de solução foi função do treino administrado.

#### MÉTODO

##### A. Animais

Foram utilizadas 32 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar fêmeas, de aproximadamente 4 meses de idade. Destas, 15 eram da linhagem LAB (Low Anxiety-like Behavior) e 17 da linhagem HAB (High Anxiety-like Behavior). Todos os animais foram oriundos do biotério de criação da Universität Regensburg, em Ratisbona, na Alemanha e todos os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com os padrões éticos da mesma.

Durante os experimentos, os animais foram alojados em uma sala biotério adequadamente climatizada e ventilada, de acordo com as normas estipuladas pela FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations – [www.felasa.eu](http://www.felasa.eu)) no Departamento de Neurobiologia Comportamental e Molecular da Universität Regensburg. Nesta, as luzes foram mantidas em ciclo claro/escuro de 12/12h, com início às 7h. Os experimentos sempre ocorreram no período claro dos animais e foram conduzidos em uma sala experimental adjacente e conectada ao biotério, com mesmas condições climáticas e de iluminação.

Os animais foram mantidos em alojamento em grupo, com entre 3 e 4 sujeitos por caixa viveiro (60 x 40 x 20 cm) de poliuretano com grade de alimentação superior. As caixas viveiro, que eram trocadas completamente 2 vezes por semana, tinham o chão coberto de maravalha e continham também um quadrado de material para fabricação de ninhos (“*nestlets*”) por animal.

Acesso livre a alimento seco para ratos e água era mantido fora do período de sessão. O alimento, entretanto, era removido uma hora antes da sessão de treino ou teste para garantir que o animal não estivesse recentemente saciado ao início da sessão.

Os sujeitos de cada linhagem foram divididos em três grupos, de acordo com o treinamento recebido: Treino Completo (TC) com  $n(\text{HAB}) = 5$  e  $n(\text{LAB}) = 6$ , Treino Incompleto (TI) com  $n(\text{HAB}) = 6$  e  $n(\text{LAB}) = 4$  e Sem Treino (ST) com  $n(\text{HAB}) = 6$  e  $n(\text{LAB}) = 5$ .

## **B. Equipamentos**

### *Labirinto em Cruz Elevado (EPM)*

O EPM era formado por dois braços, um aberto (90 x 10 cm) e um fechado (90 x 10 x 40 cm), unidos por uma plataforma central de 10 x 10 cm e distando cerca de 80 cm do chão. O aparato era feito de acetato preto opaco e estava situado em uma sala isolada de madeira. O teste podia ser observado de uma sala adjacente por um sistema de câmeras e era classificado imediatamente por um aluno do departamento com treinamento para tal.

### *Avaliação do Ciclo Estral*

Hastes flexíveis de algodão, lâminas (26x76mm) e lamínulas (18x18mm) de vidro para microscopia. Um microscópio de luz CANON (10, 20, 40 e 100x de ampliação).

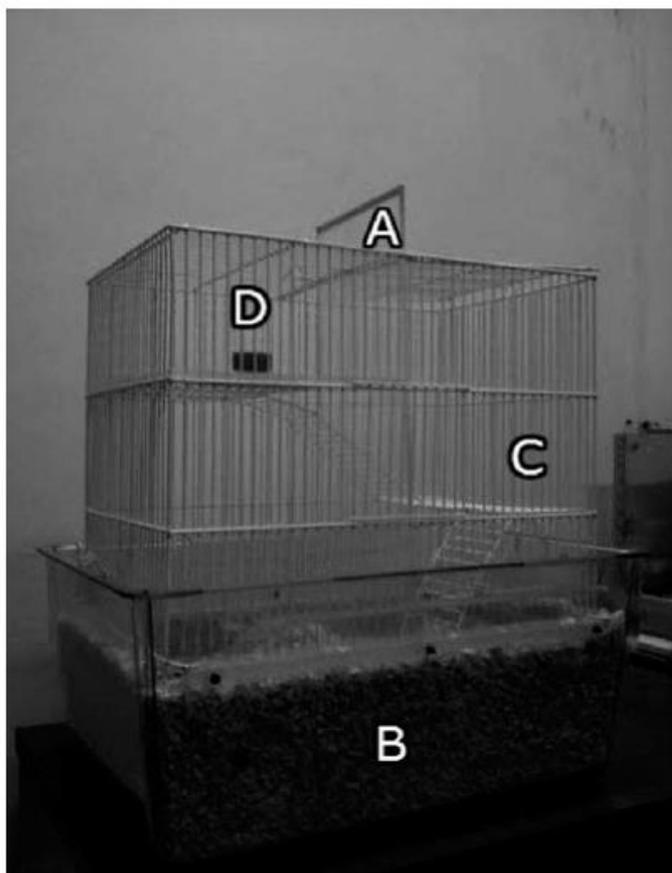
### *Campo aberto (OF)*

Uma caixa experimental de acetato opaco preto, de 80 x 80 x 40 cm com uma divisória no meio separando-a em duas, resultando em dois campos de 80 x 40 x 40 cm.

### *Caixa experimental*

O equipamento elaborado teve base na caixa experimental proposta por Neves Filho et al (2015) (fig. 1), visando uma situação problema cuja solução também fosse função dos mesmos comportamentos ecologicamente relevantes. Algumas modificações em relação ao equipamento original, entretanto, foram consideradas necessárias.

**Figura 1.** Caixa de cavar e escalar de Neves filho et al. (2015)



*Notas:* Caixa original desenvolvida por Neves filho et al. (2015), usada como base para o desenvolvimento da caixa experimental utilizada no presente estudo. A caixa original contava com dois andares e um meio andar; esta disposição foi alterada para facilitar a observação detalhada do comportamento durante a situação de solução.

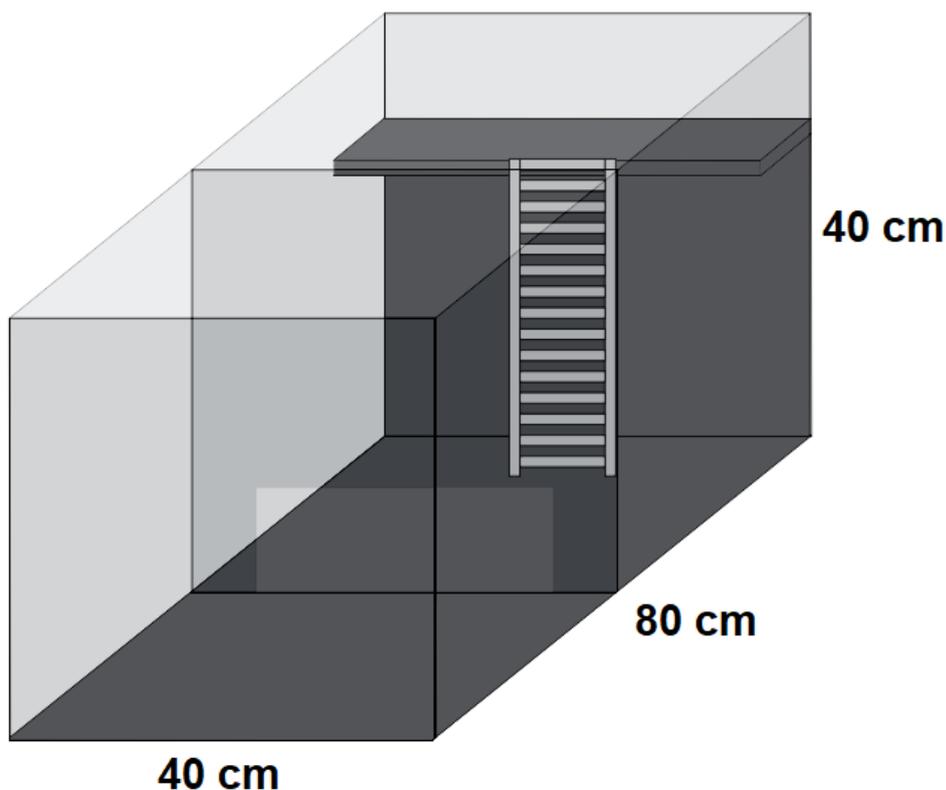
Primeiramente, enquanto a caixa desenvolvida por Neves filho et al (2015) possui um total de três andares (no caso, o chão com maravalha, a primeira plataforma e a segunda), optamos por uma caixa com somente dois andares (o chão com maravalha e plataforma contendo alimento) e disposta de maneira horizontal. Dessa forma, uma observação mais detalhada do comportamento dos animais durante o teste foi possível, já que filmagem superior permitiu visualização e filmagem não obstruída do sujeito experimental durante o teste. Adicionalmente, o acrílico divisor na caixa de Neves filho et al (2015) apresenta somente uma abertura no lado inferior esquerdo sendo, dessa maneira, possível que o animal apresente o comportamento desejado de cavar em frente à divisória porém não encontre a passagem, entrando assim em extinção. Esse padrão comportamental foi observado repetidamente em uma testagem piloto (dados não

mostrados). Em função disso, optamos por expandir a passagem de maneira que ela se estendesse ao longo de toda base da divisória.

Foi elaborada então uma caixa (80 x 40 x 40 cm) que contava com duas câmaras (C1 e C2, de 40 x 40 x 40 cm cada), conectadas por uma parede de acrílico translúcido, com uma abertura de 28 x 10 cm. As demais paredes do aparato eram feitas de acetato preto opaco. C2 contava com uma plataforma (10 x 40 cm), distando 30 cm do chão da caixa, e uma escada (10 x 30 cm) de metal, possibilitando acesso à plataforma. Uma ilustração da caixa pode ser vista na figura 2. A solução da situação problema foi composta de cavar na maravalha no chão para acessar uma passagem (B) em uma parede de acrílico transparente (A), através do qual o indivíduo ganha acesso a um novo ambiente (C); neste novo ambiente o comportamento de subir escadas até o topo de uma plataforma teria então como consequência permitir acesso a um reforçador, no caso, alimento.

## Figura 2

*Caixa de cavar e escalar desenvolvida por Knaus*



*Notas:* Caixa experimental desenvolvida para o experimento I, apresentada em sua configuração de teste, porém sem maravalha, para facilidade de visualização. Da mesma maneira, as paredes da caixa eram opacas, com exceção da divisória entre C1 (o compartimento mais a frente) e C2 (compartimento ao fundo, possuindo a escada e plataforma).

### *Consequência*

Tampas de garrafa PET padrão de cerca de 3 cm de diâmetro (adiante referidas como “comedouro”). O cereal matinal “*Kellogg’s Honey BSSS Loops*”, um cereal de milho e mel, sem corantes artificiais e aromatizantes, foi utilizado como consequência durante o treino e testes de resolução de problemas. O cereal demonstrou alta palatabilidade entre os animais, apresentando valor reforçador mesmo na ausência de privação. Cada anel de cereal era quebrado antes de ser dado aos animais, resultando em duas partes iguais; cada meio anel era considerado uma consequência durante o treino.

### *Filmagem & Registro*

As sessões foram gravadas utilizando uma configuração de câmara montada a trilhos móveis no teto da sala experimental. O vídeo da sessão podia ser visualizado ao vivo de uma sala adjacente à sala de teste, em um computador de mesa IBM-PC, no qual o vídeo era gravado automaticamente, em resolução de 480:640 e taxa de 25 quadros/segundo.

### *Software*

Foi utilizado o programa *The Observer* da NOLDUS para mensurar a distância percorrida pelos animais durante o teste de campo aberto. *BORIS* (Behavioral Observation Research Interactive Software; Friard e Gamba, 2016) foi utilizado para registrar os comportamentos emitidos durante a sessão de teste. Testes estatísticos foram feitos no programa *GraphPad Prism 9,1* que também foi utilizado para criar gráficos.

## **C. Manejo Experimental e limpeza dos equipamentos**

As ratas receberam pelo menos uma semana de habituação ao biotério antes do início de qualquer experimento. Também foram manipuladas individualmente por pelo menos um minuto, por dois dias seguidos. Ratas muito assustadas eram manipuladas até que respostas de fuga e estresse, como gritos, estivessem ausentes.

As ratas eram levadas para a sala na qual o EPM era efetuado 24 horas antes do teste ser conduzido. Para o campo aberto, eram levadas para o ambiente no qual o teste era feito pelo menos uma hora antes do teste. Em ambos os casos, o equipamento era

lavado com solução de limpeza apropriada entre cada animal, visando remover odores característicos e eventuais fezes/urina.

Por último, os sujeitos foram habituados à consequência antes do Teste I. Para tal, foram colocados 5 anéis de cereal, por animal, dentro da caixa viveiro, e deixados de um dia para o outro, por dois dias consecutivos. Foi tomado cuidado para observar que todos os animais consumiram ao menos um anel, e que todos os anéis haviam sido consumidos no dia seguinte, pela manhã.

## **D. Procedimento**

### EPM

A rata era colocada no centro do labirinto, de frente para um braço fechado. Era, então, deixada a explorar o aparato livremente por cinco minutos, durante os quais seu comportamento era registrado, quanto à porcentagem de tempo total passada nos braços abertos, assim como o número de entradas (definidas como a inserção de pelo menos ambas patas frontais e cabeça do animal dentro do braço) nos braços fechados.

### Avaliação do ciclo estral

O controle do estro foi feito duas vezes, antes de ambos os testes. A primeira tomada de estro teve função meramente de habituar o animal ao procedimento e por isso não teve os dados analisados.

Foi utilizado o método do esfregaço, no qual um cotonete levemente umedecido com água destilada é inserido na cavidade vaginal da rata, e manipulado gentilmente, de maneira a coletar células presentes na área. A coleta foi feita com cuidado para não inserir o cotonete a profundidade maior do que cerca de 1 cm, e não estimular demasiado a região cervical, para evitar pseudogravidez (Goldman et al., 2007; Paccola, 2013). O material era então imediatamente transferido para uma lâmina de microscopia e posteriormente observado à magnificação de 40x em microscópio de luz. O estro foi então classificado de acordo com a morfologia de células presentes nas amostras (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002). Optou-se por não usar coloração nas amostras, uma vez que foi demonstrada que esta não afeta a precisão na quantificação do estro (Yener et al., 2007). As ratas então foram classificadas quanto ao estágio estral relativo aos níveis circulantes de estrogênio – “Alto estrogênio” (proestro, transição entre diestro e proestro e transição entre proestro e estro) e “Baixo estrogênio” (diestro, estro, metaestro e transição entre estro e metaestro, assim como metaestro e diestro) (Jaric et al., 2019).

### Campo Aberto

Esse teste foi utilizado como uma medida de atividade geral dos animais. A rata era colocada no centro do campo aberto, e a partir desse momento, 5 min eram contabilizados até o fim do teste. Os testes foram filmados e analisados utilizando o software NOLDUS®, que mediu o total de distância percorrida por cada animal.

### Teste I (Teste Pré-treino)

As ratas foram expostas à situação problema. O alimento foi retirado das gaiolas viveiro uma hora antes do teste. O teste teve duração de 10 min. Para obter a consequência, o animal, colocado na câmara inicial (C1), precisa cavar na maravalha em direção à plataforma (e alimento) na C2, encontrar a passagem na divisória transparente presente entre as câmaras, localizada abaixo do nível da maravalha, cruzar para a C2, subir a escada e então acessar a plataforma e, dessa maneira, a consequência.

### Treino

Os animais do grupo ST não receberam treino, e nesta etapa somente eram transferidos para uma caixa viveiro diferente por uma duração equivalente a uma sessão de treino. Os demais (TC e TI) receberam o mesmo treino ao comedouro e de escalar, porém receberam diferentes quantidades de treino de cavar, conforme será descrito a seguir.

Todas as sessões de treino e teste de resolução de problemas foram conduzidas na caixa experimental (fig. 2), porém, durante os treinos, estava presente uma divisória preta opaca, do mesmo material das paredes da caixa, e inteiriça, entre C1 e C2. Dessa maneira, não era possível que o animal visualizasse ou cruzasse para o outro lado da caixa experimental durante o treino.

As sessões de treino tinham como critério o consumo de 10 consequências ou 10 min, qual ocorresse primeiro. Todos os repertórios foram treinados por meio de reforço diferencial por aproximações sucessivas. Após o treino ao comedouro, as sessões de treino de cavar e escalar se deram de maneira intercalada, com os animais recebendo 1 ou 2 sessões de treino por dia. Não foram estabelecidos critérios rígidos de aprendizagem para cada sessão, de forma que o aumento de exigência no treino foi determinado pelo desempenho de cada animal individual. Embora o treino tenha sido individualizado, o número total de sessões para cada grupo foi padronizado.

### *Treino ao comedouro*

As ratas receberam duas sessões de treino ao comedouro. Nestas, eram colocadas em uma caixa experimental de 40 x 40 x 40 cm (C1), com cerca de 3 cm de profundidade de maravalha dentro, e deixadas a habituar por 2 min. Após esse tempo, 5 tampas com um anel de cereal inteiro dentro eram colocadas dentro da caixa junto do animal. Cada vez que a rata consumia o cereal, outro anel era colocado em seu lugar. Essa fase tinha como critério a ingestão de 5 anéis ou a passagem de 10 minutos. A segunda sessão era igual à primeira. Animais que não ingeriram pelo menos 3 anéis na segunda sessão foram expostos à uma sessão extra.

### *Cavar*

Na mesma caixa utilizada no treino de comedouro, foi feito o treino do repertório de cavar. As sessões começaram com pouca maravalha e com comedouros colocados próximos à superfície da mesma. Conforme o treino progrediu, foram aumentadas a quantidade de maravalha e a profundidade na qual os comedouros eram enterrados. Uma vez que o comportamento de consumir o alimento em uma tampa enterrada a 15 cm de profundidade era emitido, as ratas foram distribuídas em dois grupos: Treino Completo (TC) e Treino Incompleto (TI).

TI - Cavar sem direcionalidade: o treinamento foi interrompido uma vez que o comportamento de cavar, porém não sua direcionalidade, estava instaurado. Estes animais apresentavam comportamento de cavar a maravalha, fundo suficiente para cobrir o corpo do animal, e consumir consequências encontradas em pontos fixos e recorrentes. Porém, estavam ausentes comportamentos como buscar (e.g.: farejar pela caixa) e cavar diretamente em cima de onde o alimento estava enterrado.

TC - Cavar com direcionalidade: as ratas desse grupo receberam duas sessões a mais de treino do que as do grupo TI. Nessas sessões o número de tampas presente durante cada tentativa foi reduzido até 2. Os animais deviam buscar uma consequência, enterrada em um ponto aleatório da caixa a 15 cm de profundidade, encontrar o local no qual a consequência estava enterrada e então cavar até alcançá-la, sendo o critério de aprendizagem a emissão dessa cadeira e comportamentos por pelo menos 5 vezes em uma sessão de até 10 min.

### *Escalar*

Esse treino teve como objetivo ensinar as ratas a acessarem a plataforma na qual se encontrava as consequências, usando uma escada de metal localizada no centro de C2. Para tal, comedouros contendo pedaços de cereal foram colocados na plataforma e ao longo da escada, encaixados dos degraus inferiores até os superiores. Conforme o animal apresentava o comportamento de se aproximar a escada e subi-la parcialmente para consumir as consequências, a quantidade de alimento nos comedouros afixados à escada foi reduzida, dos inferiores aos superiores, até sua remoção completa, deixando somente os comedouros presentes na plataforma. Ao final, o animal tinha como meta de treino subir a escada e acessar a plataforma e então obter a consequência presente no comedouro.

### Teste II

O segundo teste (Teste II) foi conduzido uma vez que as ratas atingiram critério de aprendizagem em ambos os repertórios, e teve 10 min de duração. Sua disposição foi idêntica ao Teste I.

Medidas foram tomadas para minimizar a possibilidade e probabilidade de resoluções chamadas “de força bruta” (no caso, soluções por pulo, tanto para a plataforma em C2 quanto sobre a divisória entre C1 e C2), porém as mesmas foram observadas em alguns casos pontuais. Nestes, não foi considerada a presença de solução, a não ser que o animal posteriormente tenha atingido o roteiro comportamental previsto. A saber, o comportamento de resolução foi definido como a ocorrência da sequência de: cavar em frente à divisória fundo o suficiente para acessar a passagem entre C1 e C2, seguido do cruzamento de C1 para C2 por meio da abertura e, então, subir a escada e obter uma consequência colocada em cima da plataforma. Interrupções na sequência como farejar pela caixa não foram consideradas como critério para não ocorrência de solução, como em Neves filho et al. (2015). O retorno de C2 para C1 antes da obtenção do reforçador, entretanto, foi considerado um critério para a solução ser considerada do tipo “não recombinação”.

A figura 3 ilustra a ordem de apresentação dos testes e treino administrados aos animais.

**Figura 3***Ordem de procedimentos*

*Notas:* Eventos conectados por uma barra preta vertical ocorreram no mesmo dia. 'EPM' se refere ao Labirinto em Cruz Elevado e 'OF' ao Campo Aberto. Em dias com a indicação de "Estro" foi coletado material vaginal para mensuração do estro.

### **E. Critérios de exclusão**

Foram utilizados dois critérios de exclusão que levaram à remoção de animais do experimento. Em primeiro lugar, as ratas eram selecionadas com base em seu desempenho no EPM, efetuado às 9 semanas de vida. Neste, animais da linhagem HAB que apresentassem mais do que 15% do tempo passado no braço aberto e animais LAB que o fizessem por menos de 30% do tempo de sessão eram removidos por não atingirem critério da linhagem.

Em segundo lugar, a resolução do problema em sua primeira exposição (pré-teste) também foi utilizada como critério de remoção do experimento.

### **F. Análise dos dados**

Vídeos das sessões de teste foram analisados utilizando o software BORIS. Para tal, foi elaborado um etograma de comportamentos possíveis emitidos durante a sessão (para comportamentos e descrição, ver Tabela 2). Estes comportamentos foram classificados de duas maneiras, de acordo com as possibilidades do programa: comportamentos do tipo "Estado" apresentavam duração prolongada, e não um evento único discreto, como é o caso de comportamentos do tipo "Ponto". Comportamentos "Estado" foram analisados quanto a frequência e duração (tempo relativo da sessão dedicado ao comportamento), enquanto comportamentos "Ponto" foram analisados somente quanto a frequência.

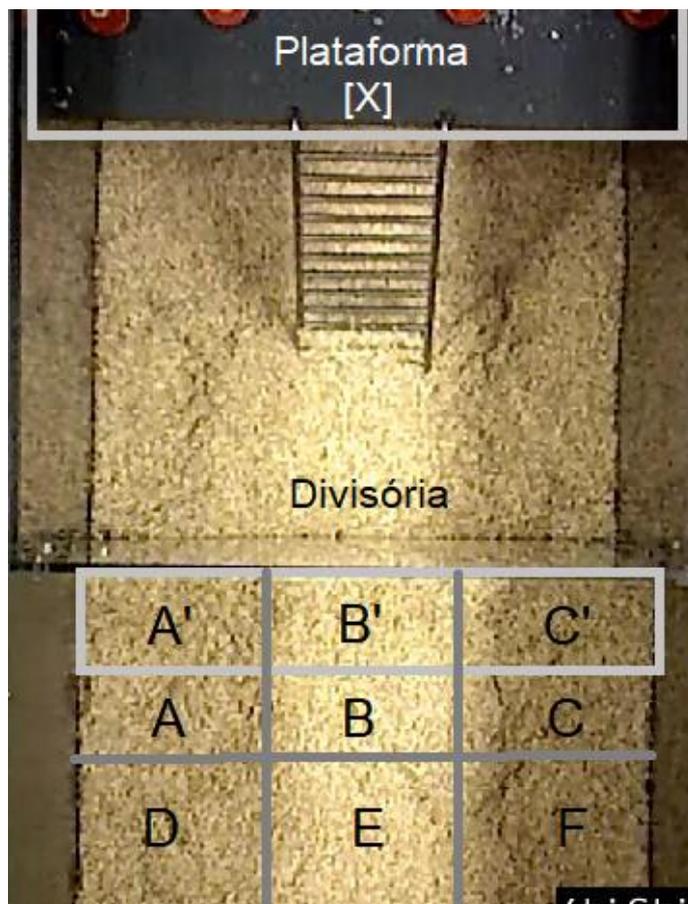
**Tabela 2***Etograma de comportamentos registrados*

Estado		Ponto	
Comportamento	Descrição	Comportamento	Descrição
Cavar	Cavar na maravalha.	Pular	Pulos, contra as laterais da caixa ou em direção à plataforma.
Submerso	Estar embaixo da maravalha.	Consumir	Ingerir reforçador.
Grooming	Autolimpeza de diferentes tipos.		
De Pé	O Animal está em postura ereta, nas patas traseiras.	Defecar	Evacuação de bolo fecal.
Carregar Reforçador	Quando o animal leva o reforçador consigo na boca.		
Escada (C2)	Estar em cima da escada.	Subir/Descer (C2)	Usar escada para subir ou descer.

Adicionalmente, os vídeos também foram analisados quanto à locomoção e alocação de tempo em diferentes locais da caixa teste. Esta análise também foi feita utilizando o software BORIS. Para tal, C1 foi dividida em 6 regiões (A, B, C, D, E e F) e C2 em uma área de interesse (X) (Figura 4). Quando o animal cruzava de uma área para outra (no caso, considerado quando pelo menos a metade da frente do animal se localizava na nova área) era registrada uma locomoção, além de registrado o tempo passado cavando em cada área. Adicionalmente, em áreas adjacentes à divisória entre C1 e C2, era registrado quando o animal estava com a cabeça orientada para a divisória, imediatamente em frente à mesma (A', B', C').

**Figura 4**

*Diagrama utilizado para classificação de local dos animais durante o Teste*



*Notas:* Demarcação das áreas utilizadas para análise do comportamento das ratas durante o teste. C1 está separada em seis áreas maiores (A, B, C, D, E, F) e três sub-áreas adjacentes à divisória (A', B' e C'). C2 teve uma área de interesse (X) marcada, referente à plataforma.

### **G. Análise Estatística**

A distância percorrida (cm) pelas ratas no teste de campo aberto foi analisada usando um teste de Mann Whitney.

A ocorrência ou não de solução em cada linhagem foi contrastada usando um teste exato de Fischer.

Para analisar a quantidade de reforçadores no treino, foi usada uma ANOVA de dois fatores (Treino e Linhagem), seguida de comparações múltiplas foram feitas usando o teste de comparações múltiplas, com correção de Holm-Šídák. A locomoção durante a sessão, medida em cruzamentos entre áreas, foi analisada de maneira similar.

O tempo passado cavando total, calculado em porcentagem do tempo total de sessão, foi contrastado fazendo uso de uma ANOVA de dois fatores (Treino e Linhagem). Já o tempo passado cavando em cada área de C1 foi comparado com uma ANOVA de fatores Área e Grupo, seguida de comparações múltiplas com correção de Holm-Šídák. Por fim, foi utilizada uma ANOVA de três fatores (Treino, Linhagem e Local) da mesma maneira que o tempo passado cavando na porção da frente e do fundo da caixa.

## RESULTADOS

### EPM

Foram testadas 15 ratas da linhagem LAB no EPM; o critério estipulado para a linhagem foi de no mínimo 20 % do tempo de teste passado nos braços abertos do labirinto. Estes animais passaram em média 40,11% ( $\pm 6,01$ ) da sessão nos braços abertos.

Da linhagem HAB, foram testadas 17 ratas, com critério de no máximo 10% do tempo de sessão passado nos braços abertos. Elas passaram em média 3,36% ( $\pm 3,82$ ) da sessão nos braços abertos.

### Avaliação do ciclo estral

Houve poucas ocorrências de animais em estágio de alto estrogênio durante a sessão de teste (Tabela 3). A maior parte dos animais, em todos os grupos, se encontrou em estágio de baixo estrogênio. Foi observado que ambas as ratas HAB que estavam em proestro, fase de alta de estrogênio, resolveram o problema, porém a mesma relação não ocorreu para ratas LAB.

**Tabela 3**

*Classificação do estágio do ciclo estral no dia do Teste II*

	<b>Alto estrogênio</b>	<b>Baixo estrogênio</b>
HAB	1	5
ST		
HAB TI	0	6
HAB	1	4
TC		
LAB ST	1	4
LAB TI	1	3
LAB TC	0	6

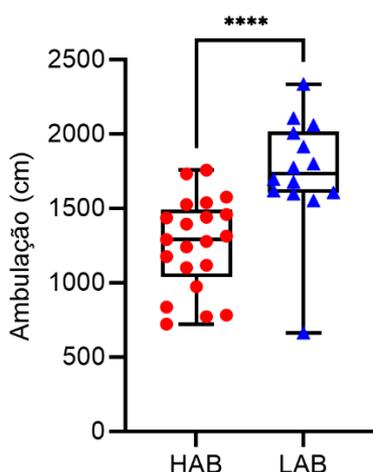
*Nota:* número de animais em cada grupo a apresentar estágio do ciclo estral de alto ou baixo estrogênio.

### Campo Aberto

Os animais da linhagem LAB caminharam em média 1742 ( $\pm 387,6$ ) cm durante o teste de ambulação, enquanto os animais HAB percorreram em média 1260 ( $\pm 309,4$ ). Análise via o teste de Mann Whitney revelou que essa diferença foi significativa,  $U(N_{HAB}=21, N_{LAB}=14)=34=P<0,0001$  (figura 5). Os dados de uma rata LAB não puderam ser analisados em função de limitações do programa.

### **Figura 5**

#### *Ambulação no Campo Aberto*



Notas: Centímetros percorridos durante o teste de ambulação.  $N_{HAB}=21$  e  $N_{LAB}=14$ .

\*\*\*\*=  $P<0,0001$

### Teste I (Teste Pré-treino)

Nenhum dos animais alcançou a consequência durante a primeira exposição ao teste.

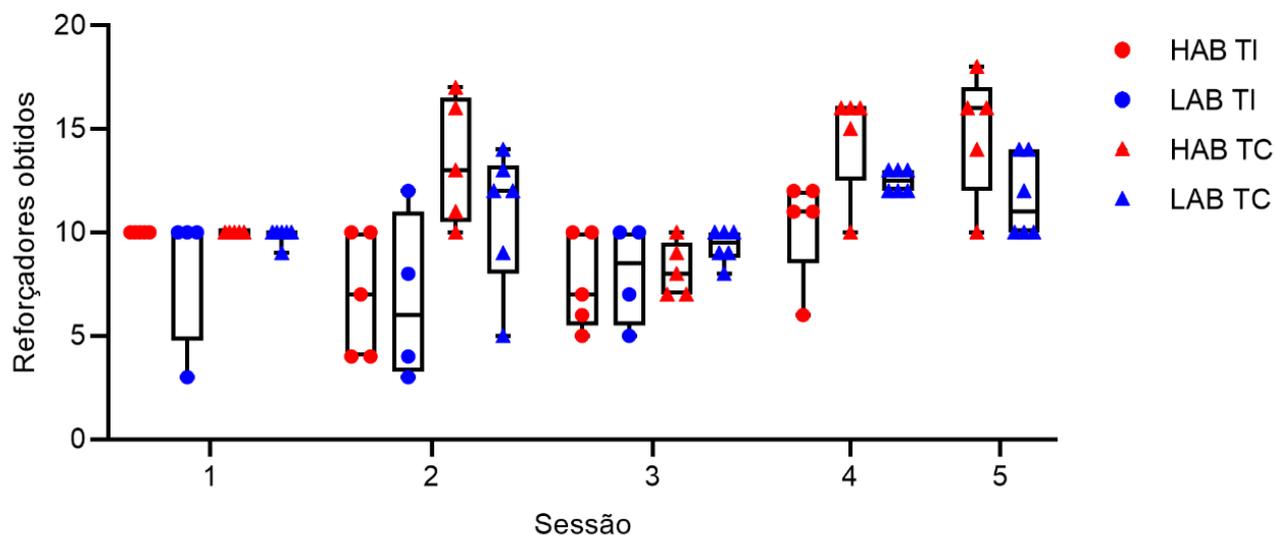
### **Treino**

#### *Cavar*

As ratas LAB do grupo TI precisaram de três sessões de cavar para atingir critério, enquanto as ratas HAB TI necessitaram de quatro. Já os animais do grupo TC de ambas as linhagens precisaram de 5 sessões para atingir o critério. O desempenho por sessão de cada grupo pode ser observado na figura 6.

**Figura 6**

*Reforçadores obtidos por sessão de treino de cavar*



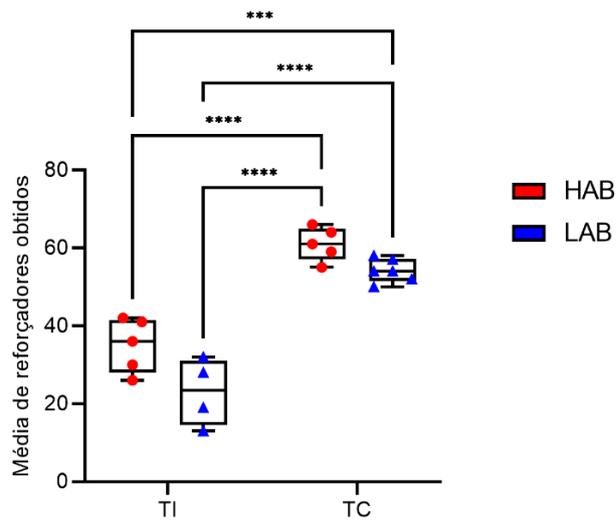
*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de cavar. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

A quantidade total de reforçadores obtidos ao longo do treino de cavar variou entre grupos e linhagens. HAB TI receberam em média  $35 \pm 6,928$  reforçadores, enquanto HAB TC obtiveram em média  $61 (\pm 4,301)$  reforçadores. LAB TI, por sua vez, receberam em média  $23 (\pm 8,602)$  reforçadores, enquanto LAB TC obtiveram  $54,1667 (\pm 2,994)$  reforçadores. Uma ANOVA de dois fatores (Linhagem e Treino) encontrou que o Treino ( $F(1)=0,9815$ ;  $p=0,3366$ ) quanto a Linhagem ( $F(1)=14,04$ ,  $p=0,0023$ ) tiveram um efeito sobre a quantidade total de reforçadores obtidos por cada grupo, porém interação entre os fatores não foi observada.

Comparações múltiplas de Holm-Šidák encontraram que só HAB TC e LAB TC não tiveram diferenças entre si; dos demais, HAB TC diferiu de HAB TI ( $p < 0,001$ ) e LAB TI ( $p < 0,0001$ ), HAB TI foi diferente de LAB TC ( $p = 0,0001$ ) e LAB TI ( $p = 0,0137$ ) e LAB TC diferiu de LAB TI ( $p < 0,0001$ ) (figura 7).

**Figura 7**

*Reforçadores obtidos no treino de Cavar*



*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de cavar por grupo de treino. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

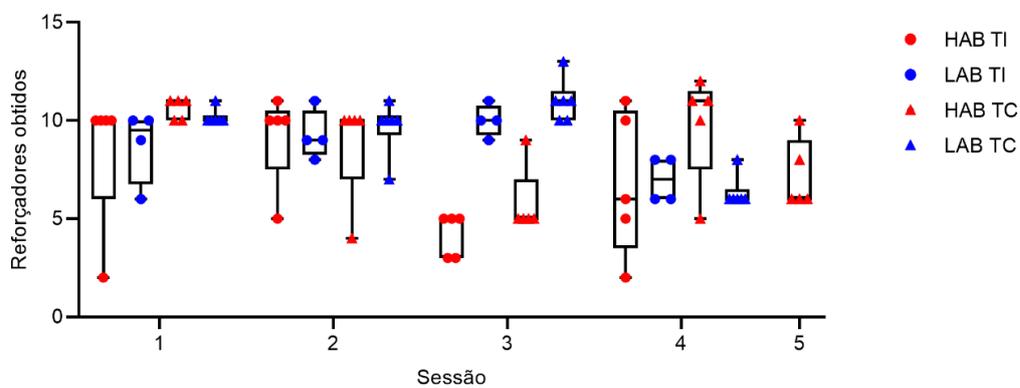
\*\*\*=  $p=0,0137$ ; \*\*\*\*= $p<0,0001$

### *Escalar*

Foram necessárias 4 sessões para os grupos LAB TI, LAB TC e HAB TI atingirem critério durante o treino de escalar; o grupo HAB TC precisou de uma sessão extra, totalizando 5 sessões (figura 8).

**Figura 8**

*Reforçadores obtidos por sessão de treino de escalar*

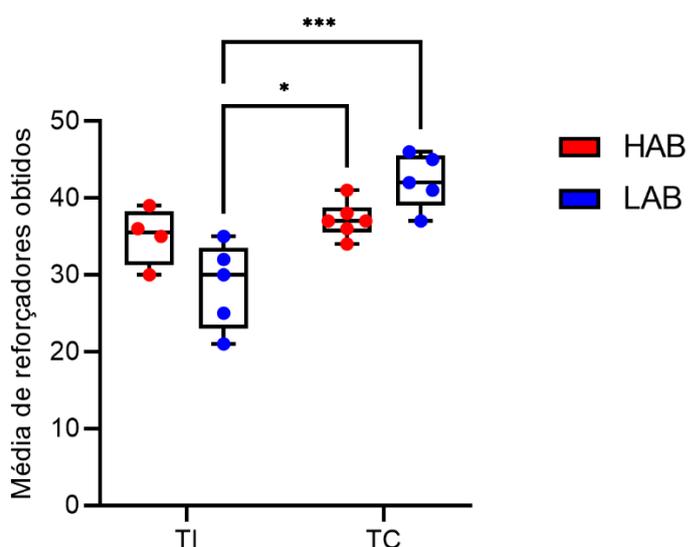


*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de escalar. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

A quantidade de reforçadores obtidos durante o treino de escalar também variou entre grupos. HAB TI atingiu 28,6 ( $\pm 5,594$ ) reforçadores, em comparação a 42,2 ( $\pm 3,563$ ) do grupo HAB TC; para LAB a diferença foi menor; LAB TI obtiveram 35 ( $\pm 3,741$ ) reforçadores e LAB TC 37,166 ( $\pm 2,316$ ). Uma ANOVA de dois fatores (Treino e Linhagem) encontrou interação entre os fatores ( $F(1) = 10,46$ ,  $p=0,0052$ ) e também significância para o fator Treino ( $F(1)= 19,89$ ,  $p=0,0004$ ). Comparações múltiplas de Holm-Šídák encontraram HAB TI obteve menos reforçadores que HAB TC ( $p=0,0003$ ) e LAB TC ( $p=0,0115$ ), porém LAB TI não diferiu de maneira significativa dos demais (figura 9).

### Figura 9

*Reforçadores obtidos no treino de escalar*



*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de escalar por grupo de treino. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

\*= $p=0,0003$ ; \*\*\*= $p=0,0115$

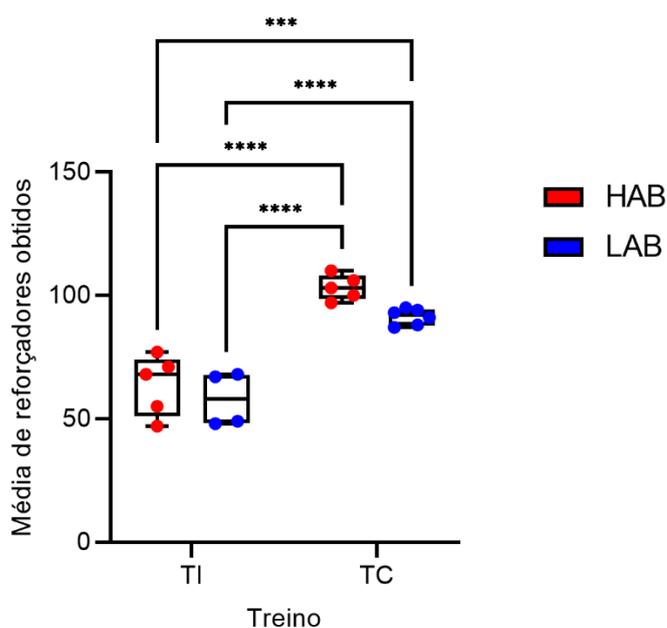
HAB TI alcançaram um total de 63,6 ( $\pm 12,280$ ) reforçadores, HAB TC 103,2 ( $\pm 5,069$ ), LAB TI 58 ( $\pm 10,984$ ) e LAB TC 91,333 ( $\pm 3,265$ ).

Uma ANOVA de dois fatores comparando a quantidade total de reforçadores obtidos durante o treino encontrou que o fator 'Treino' (TI ou TC) foi determinante da quantidade total de reforçadores obtidos ( $F(1)=92,94$ ,  $p<0,0001$ ), da mesma maneira como 'Linhagem' ( $F(1)=5,330$ ,  $p=0,0346$ ), porém não foi observada interação ( $F(1)=0,681$ ,  $p=0,0197$ ).

Comparações múltiplas usando o método de Holm-Šidák revelaram que animais de linhagens diferentes mas com o mesmo treino receberam quantidades totais similares de reforçadores (TI HAB v TI LAB:  $p=0,3335$ ; TC HAB v. TC LAB:  $p=0,0640$ ), enquanto as demais comparações intra (HAB TI v. HAB TC:  $p<0,0001$ ; LAB TI v LAB TC:  $p<0,0001$ ) e entre (HAB TI v. LAB TC:  $p=0,002$ ; LAB TI v. HAB TC:  $p<0,0001$ ) linhagens confirmaram que os diferentes tipos de treino geraram desempenhos diferentes em relação ao número total de reforçadores obtidos (figura 10).

**Figura 1.10**

*Reforçadores obtidos totais*



*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino por grupo. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

\*\*\*=  $p=0,002$ ; \*\*\*\*=  $P<0,0001$

### Teste II

Em geral, os animais da linhagem LAB que receberam treino, completo ou incompleto, apresentaram maior ocorrência de soluções durante o teste do que os animais HAB (ocorrência de soluções:  $N_{LABST}=1$ ;  $N_{LABTI}=2$ ;  $N_{LABTC}=6$ ;  $N_{HABST}=1$ ;  $N_{HABTI}=0$ ;  $N_{HABTC}=2$ ). Um teste exato de Fisher confirmou a hipótese de que animais LAB apresentaram mais

soluções do que animais HAB ( $P=0,044$ ). Já os animais controle (grupo ST) de ambas linhagem apresentaram desempenhos comparáveis (figura 11).

Do grupo LAB controle (ST), somente um animal de cinco apresentou solução, entretanto, esta se deu de maneira não direcionada, já que o sujeito retornou para C1 antes de acessar a plataforma. Metade dos animais LAB TI alcançaram o reforçador, seguindo a topografia de cavar em frente à divisória, cruzar de C1 para C2, investigar C2, subir a escada e obter o reforçador. Quatro dos seis animais LAB TC apresentaram solução com topografia similar, enquanto dois animais, em vez de utilizarem a escada, pularam direto para o topo da plataforma.

Nenhum animal HAB do grupo TI apresentou solução; do grupo ST, um animal resolveu o problema, porém com a topografia de retornar para C1 após acessar C2 pela primeira vez. Adicionalmente, um animal ST cruzou de C1 para C2, porém não acessou a plataforma de maneira alguma. Por fim, dois dos cinco animais HAB TC acessaram o alimento, um com a topografia direta, e um fez uso de pulo para acessar a plataforma em vez da escada. Conforme notado anteriormente, tanto a rata HAB ST quanto uma das HAB TC que resolveram o problema estavam em proestro.

### Figura 11

#### Desempenho no Teste

Grupo						
LAB ST (n=5)	Amarelo	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza	
LAB TI (n=4) (50%)	Verde	Verde	Cinza	Cinza		
LAB TC (n=6) (100%)	Verde	Verde	Verde	Verde	Vermelho	Vermelho
HAB ST (n=6)	Amarelo	Roxo	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza
HAB TI (n=5)	Cinza	Cinza	Cinza	Cinza		
HAB TC (n=5) (40%)	Verde	Vermelho	Cinza	Cinza	Cinza	

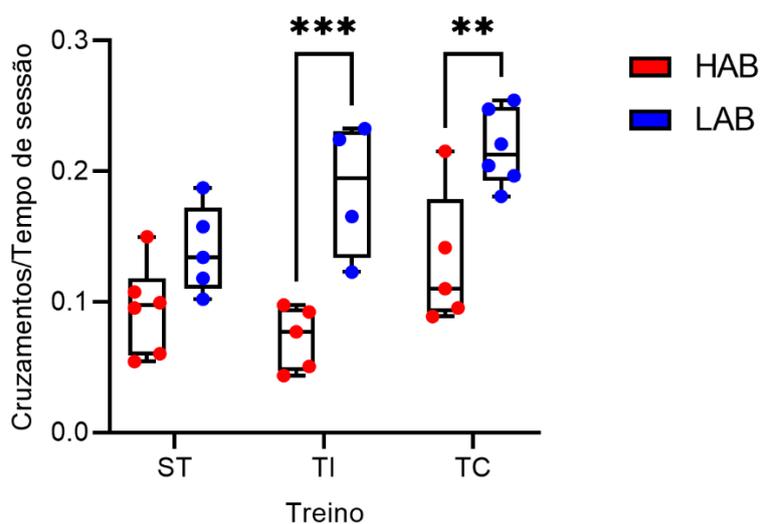
*Notas:* Cada célula colorida representa o desempenho de um sujeito em cada tentativa da fase de Teste. Verde significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada sem retornar para C1, Amarelo significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada, porém retornou para C1 antes, Vermelho significa o animal cruzou para C1 e pulou para cima da plataforma, Roxo significa que o animal cruzou de C1 para C2, mas não subiu a escada e Cinza significa que o animal não cruzou de C1 para C2.

### Comportamento durante o teste

A quantidade de cruzamentos de uma área para outra durante o teste, de acordo com o esquema da figura 3, dividido pelo tempo total de teste, foi usado como medida de ambulação para as diferentes combinações de linhagem e treino. Foi observado que os animais LAB que receberam treino apresentaram uma velocidade média maior do que os animais HAB com o mesmo treino. Os animais HAB apresentaram velocidade média de 0,094 ( $\pm 0,035$ ) para o grupo ST, 0,072 ( $\pm 0,024$ ) para o grupo TI e 0,130 ( $\pm 0,052$ ) para TC; para LAB, a média foi 0,140 ( $\pm 0,033$ ) para ST, 0,186 ( $\pm 0,052$ ) para TI e 0,217 ( $\pm 0,029$ ) para TC. Uma ANOVA de dois fatores (Linhagem e Treino) encontrou significância para ambos os fatores ( $F(2)=6,684$ ,  $p=0,1456$  e  $F(1)=35,8$ ,  $p<0,0001$ , respectivamente). Comparações múltiplas usando o método de Holm-Šidák revelou diferenças entre linhagens para os grupos TI ( $p=0,0004$ ) e TC ( $p=0,0016$ ), mas não para ST ( $p=0,0591$ ) (figura 12).

**Figura 12**

*Velocidade durante o teste*



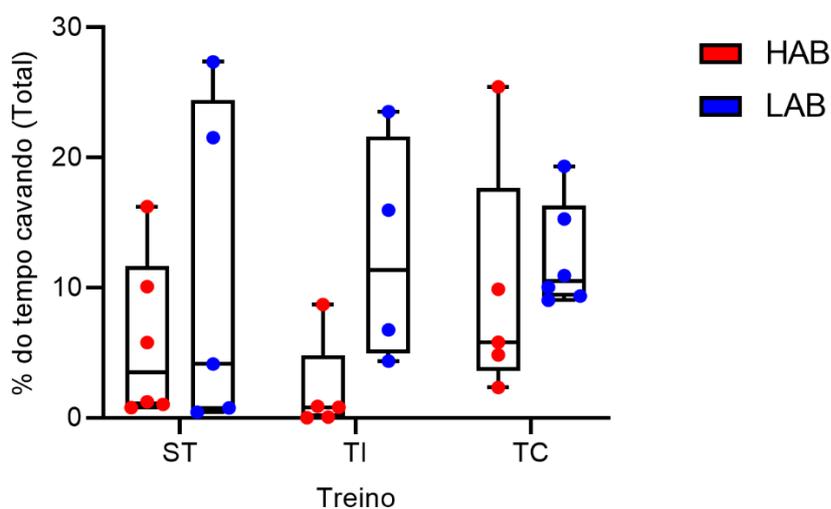
*Notas:* Número de cruzamentos entre áreas dividido pela duração da sessão (s). Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

\*\*=  $p=0,0004$ ; \*\*\*=  $p=0,0016$

O tempo passado cavando (apresentado em % do tempo total de sessão) foi comparado com uma ANOVA de dois fatores, que revelou que este diferiu em relação à linhagem ( $F(1)=4,524$ ,  $p=0,0435$ ) (figura 13). Não foram encontradas diferenças significantes nas comparações um a um. Os animais HAB ST apresentaram uma média de 5,862% ( $\pm 6,262$ ) da sessão cavando, em comparação a 2,096% ( $\pm 3,727$ ) de HAB TI e 9,654% ( $\pm 9,224$ ) para HAB TC. Já LAB ST passou 10,849% ( $\pm 12,644$ ) da sessão cavando, LAB TI 12,660% ( $\pm 8,808$ ) e LAB TC 12,33% ( $\pm 4,118$ ).

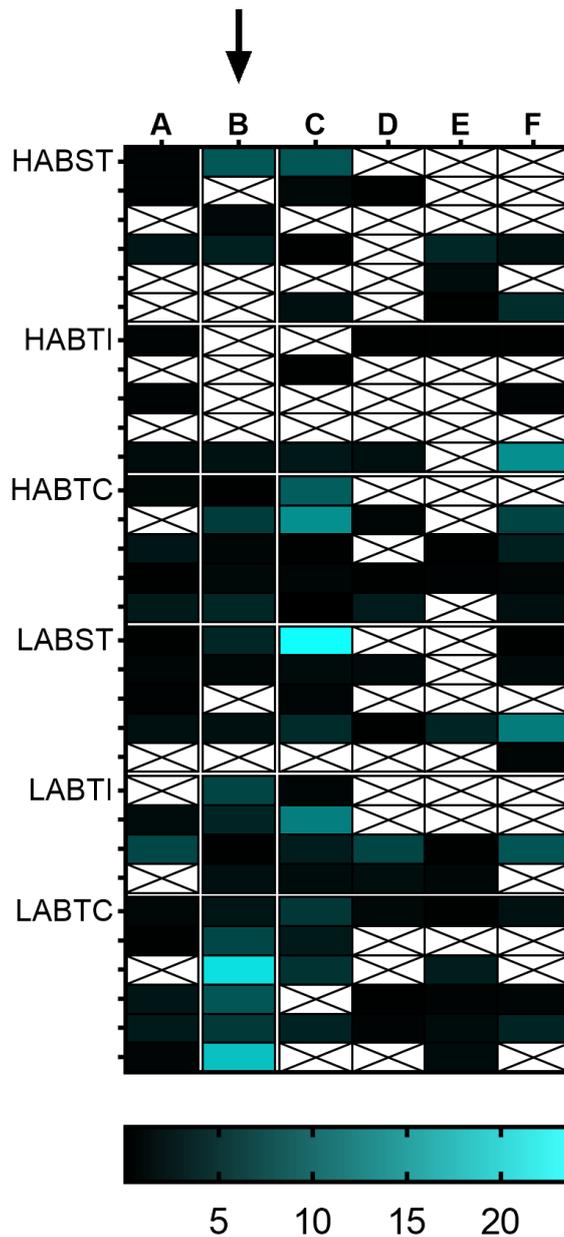
**Figura 13**

*Porcentagem do tempo de sessão passado cavando*



*Notas:* Porcentagem do tempo de sessão passado cavando. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

O comportamento de cavar em cada área (A, B, C, D, E, F) de C1 também não foi distribuído de maneira igual; a porcentagem da sessão passada cavando em cada área está representado em um mapa de cores (figura 14), no qual a maior ocorrência de cavar está sinalizado com a cor azul. Uma ANOVA de dois fatores (Área e Grupo) encontrou interação significativa entre eles ( $F(25)=1,652$ ,  $p=0,0,390$ ).

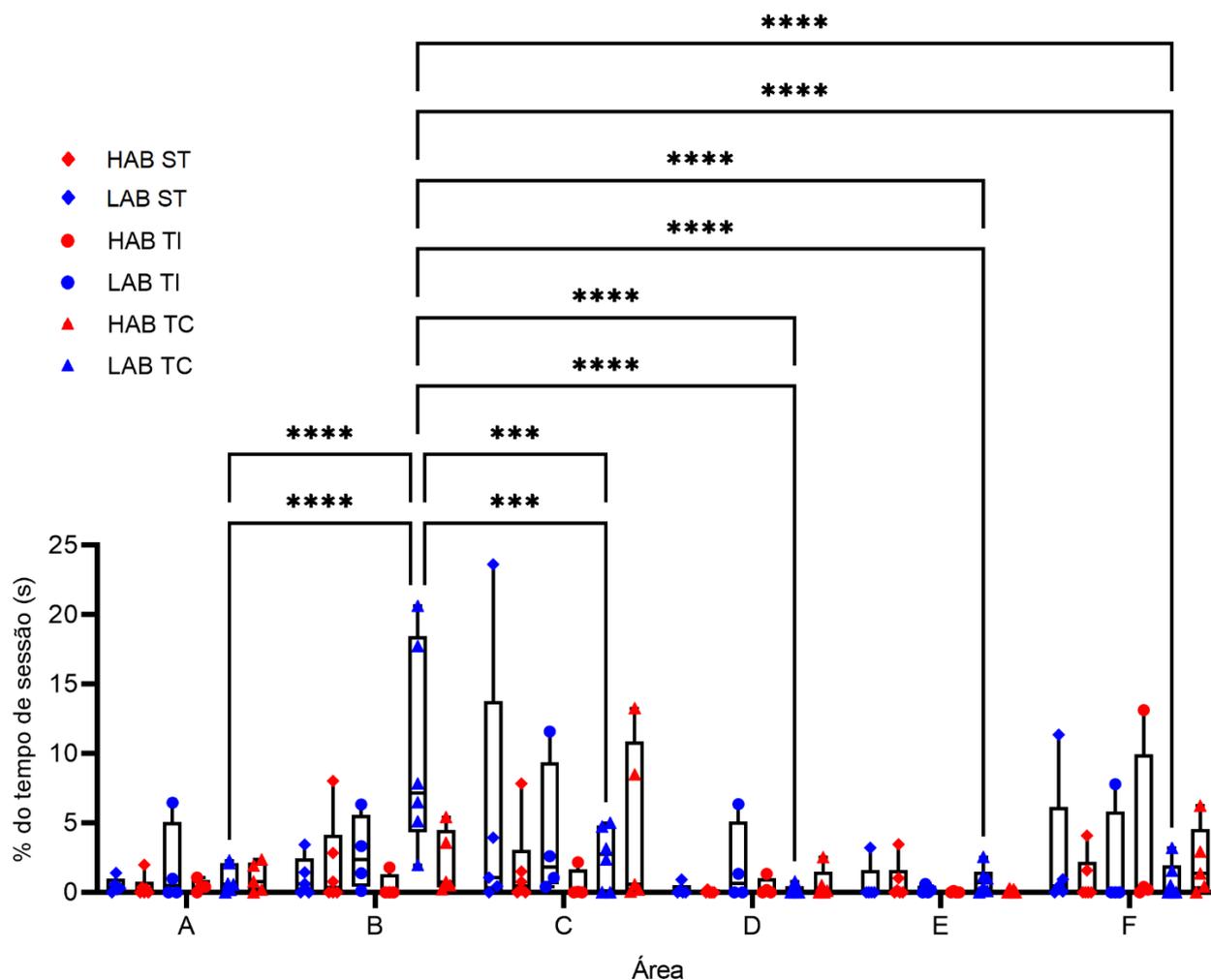
**Figura 14***Mapa de cores do comportamento de cavar*

*Notas:* Mapa de cores do comportamento de cavar em C1 durante a sessão de teste. As cores representam a porcentagem do tempo de sessão que cada animal passou cavando aquela área. Cores próximas do preto se aproximam de zero, enquanto cores próximas do turquesa indicam maior tempo passado cavando (máximo de 23.63% da sessão). Cada linha representa um animal, e cada coluna, uma das áreas de C1. Células com X indicam que não houve comportamento de cavar naquela área para aquele animal. A seta em B indica que este era a área diretamente em frente à escada localizada em C2.

Comparações múltiplas de Holm-Šidák entre as áreas para cada grupo revelaram que os animais LAB TC diferiram dos demais em relação ao tempo passado cavando em B (HAB ST v. LAB TC:  $p=0,0004$ ; HAB TI v. LAB TC:  $p=0,0002$ ; HAB TC v. LAB TC:  $p=0,0011$ ; LAB ST v. LAB TC:  $p=0,0002$ ; LAB TI v. LAB TC:  $p=0,0086$ ) (figura 15). Também foi encontrado que LAB TC passou uma quantidade de tempo cavando em B diferente das demais áreas (A:  $p<0,001$ ; C:  $p<0,001$ ; D:  $p<0,001$ ; E:  $p<0,001$ ; F:  $p<0,001$ ). Para os demais grupos não foi encontrada nenhuma diferença significativa na distribuição do cavar por C1.

**Figura 15**

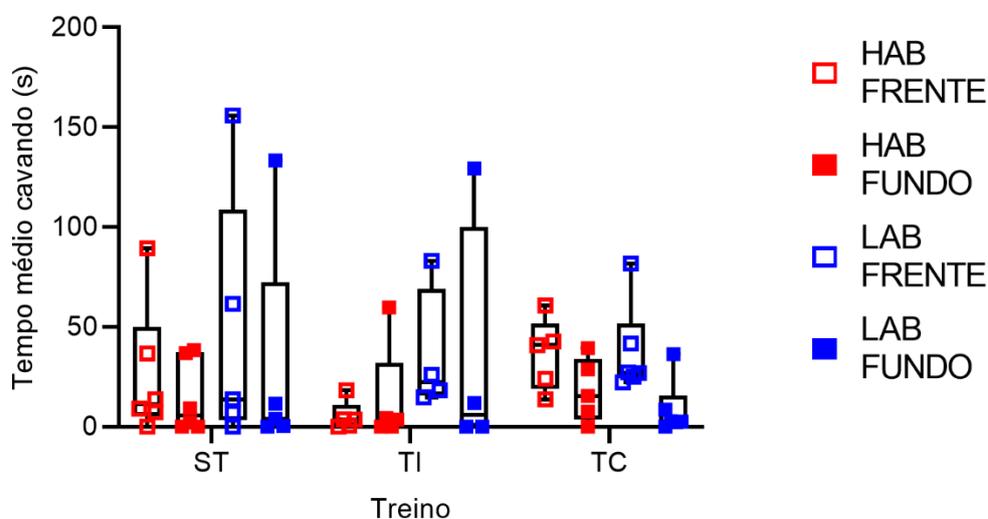
*Tempo passado cavando por área*



A distribuição do cavar entre o fundo (áreas D, E e F) e frente (A, B e C) da caixa também pareceu ser afetado com o treino (Figura 16), embora a ANOVA de três fatores (Treino, Linhagem e Frente/Fundo) não tenha encontrado significância para nenhum deles. HAB ST passou em média 26,031 ( $\pm 33,456$ ) s cavando na porção da frente, em comparação a 14,456 ( $\pm 18,321$ ) s; HAB TI passou 5,209 ( $\pm 7,499$ ) s e 13,5618 ( $\pm 25,990$ ) s respectivamente, e HAB TC passou em média 36,430 ( $\pm 18,109$ ) s cavando na frente e 18,214 ( $\pm 15,935$ ) s no fundo. Para LAB, o grupo ST passou em média 47,623 ( $\pm 65,202$ ) s cavando na frente e 29,875 ( $\pm 58,090$ ) s no fundo, enquanto TI passou 35,576 ( $\pm 32,042$ ) e 35,323 ( $\pm 62,969$ ) respectivamente, e TC passou 35,505 ( $\pm 22,746$ ) na frente e 8,77 ( $\pm 13,868$ ) no fundo.

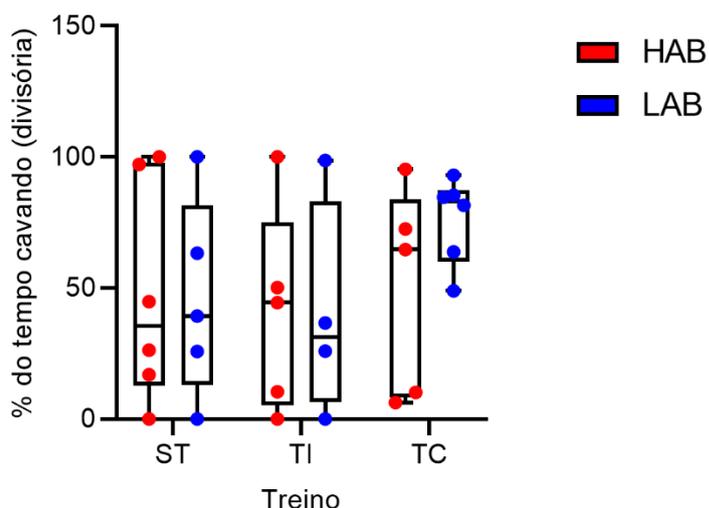
### Figura 16

*Distribuição do cavar Frente/Fundo*



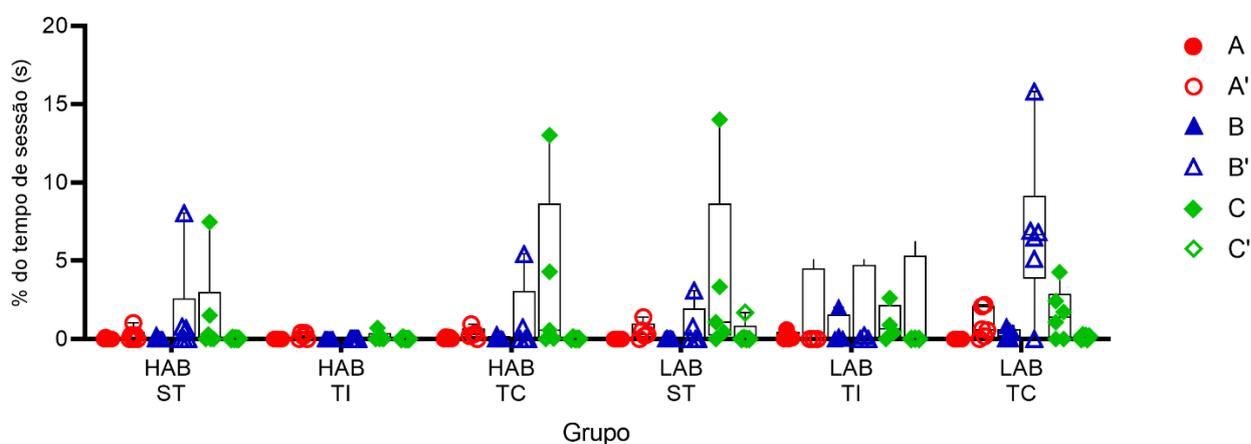
*Notas:* Porcentagem do tempo passado cavando no qual o animal estava na porção frontal (A, B ou C) ou de fundo (D, E e F) de C1. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

A eficiência do cavar (medido como o percentual do tempo cavando que foi passado cavando em frente à divisória, resposta que potencialmente resultaria em cavar encontrar a passagem entre C1 e C2) pareceu mudar para os animais LAB com o TC, conforme pode ser observado na figura 17, na qual a média para LAB TC foi de 76,245% ( $\pm 16,558$ ) de tempo de sessão cavando em frente à divisória, em comparação com 40,338% ( $\pm 41,836$ ) de LAB TI e 45,685% ( $\pm 38,021$ ) de LAB ST. Já HAB apresentou eficiência semelhante em todos os grupos (ST: 47,538% ( $\pm 42,105$ ); TI: 41,034% ( $\pm 39,348$ ) e TC: 49,8% ( $\pm 39,60$ ). Não foi encontrado efeito significativo do fator Treino ou Linhagem, entretanto, sobre a eficiência.

**Figura 17***Eficiência do cavar*

*Notas:* Porcentagem do tempo passado cavando no qual o animal estava em A', B' ou C'. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

Por fim, a distribuição de cavar eficaz (ou seja, em frente à divisória) e em demais áreas de A, B e C foi analisada. Os animais HAB TC apresentaram uma taxa de cavar eficaz em C muito maior do que os demais animais da linhagem ( $3,589\% \pm 5,571$ ), para as demais áreas. Já os animais LAB que receberam treino completo apresentaram o inverso, uma taxa bem maior de cavar não-eficaz em B, área a qual se encontrava em frente à escada em C2 ( $6,861\% \pm 5,105$ ) (figura 18).

**Figura 18***Distribuição de cavar eficaz e não eficaz*

*Notas:* Porcentagem do tempo passado cavando no qual o animal estava em A, A', B, B', C ou C'.

Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

## DISCUSSÃO

Conforme esperado, foi possível observar uma diferença entre o desempenho de resolução de problemas das linhagens HAB e LAB. Animais LAB que receberam treino, completo ou incompleto, apresentaram uma maior ocorrência de resolução dos que HAB; o desempenho dos animais que não receberam treino foi similar em ambas as linhagens. Em ambas, houve ocorrência de uma solução no grupo ST; análise da topografia e sequência comportamental, entretanto, mostraram que essas soluções foram ‘não recombinativas’, uma vez que a direcionalidade não pode ser verificada, já que em ambos os casos as ratas voltaram para C1 antes de resolver o problema. Dessa maneira, seria possível dizer que essas soluções ocorreram por exploração, em maneira similar a “tentativa e erro”. Tomado junto com as maiores taxas de solução nos animais que receberam treino completo, sendo a maior parte destas na sequência comportamental prevista, podemos dizer que existem indícios de que a ocorrência da solução durante a situação de teste é função do treino. Entretanto, a ocorrência de respostas de força bruta nos indivíduos TC (no caso, pulo para a plataforma em vez do uso da escada) não está de acordo com o previsto. De acordo, algumas mudanças ao treino e caixa experimental foram propostas para refinar o método apresentado e fortalecer o modelo, e serão discutidas no decorrer da discussão.

Foram observadas diferenças na ambulação de HAB e LAB no teste de campo aberto, conforme descrito por Liebsch e colegas (1999). O mesmo foi observado para os grupos TI e TC durante a sessão de teste, porém é interessante notar que não foi encontrada diferença entre HAB ST e LAB ST em relação à ambulação durante a sessão de teste. Dessa maneira, é possível afirmar que a maior ambulação de LAB TI e TC durante a situação teste foi função do treino e da presença de uma situação problema. O mesmo não foi observado para HAB, já que a ambulação para os três grupos desta linhagem não diferiu entre si.

A quantidade do comportamento de cavar durante a sessão de teste também variou entre grupos e linhagens. Os animais HAB TC apresentaram uma média de tempo passando cavando maior dos que HAB ST e HAB TI, indicando que esse comportamento foi função do treino. Já os animais LAB de maneira geral cavaram mais do que HAB. Pôde ser observada uma variabilidade menor no grupo LAB TC do que nos demais, indicando que o treino completo teve um efeito mais homogêneo sobre os indivíduos do que o treino incompleto.

A distribuição do cavar do por C1 também pareceu ser afetada pelo treino e linhagem. Animais de ambas as linhagens que receberam treino apresentaram menos cavar no fundo de C1 – ou seja, longe da divisória – e maior tempo cavando em áreas próximas a

esta, indicando direcionalidade para C2 no cavar. A maior eficiência no cavar nos animais LAB TC – ou seja, o aumento consistente do cavar na divisória em comparação com fora desta – também parece corroborar esta hipótese, especialmente tomada em conjunto com a maior preferência de LAB TC por cavar em B e B'. Esta área era a mais próxima da escada presente em C2. É possível que essa preferência seja função do processo descrito por Epstein (1985), que ele chamou de generalização funcional – ou seja, que, devido à associação de ambos os PRs com o mesmo reforçador, e da presença de estímulos contexto e discriminativos de ambas as situações de treino, tenha ocorrido transferência da função do estímulo “tampa com alimento” para o estímulo “escada e plataforma”. Esta transferência levaria a um cavar direcionado em direção à C2 e, especificamente, à escada, conforme foi observado nos animais LAB TC.

O mesmo não foi observado em HAB TC, entretanto, que apresentaram preferência por C. Investigação dos vídeos de sessão revelou que a área C se encontrava menos iluminada do que as demais, em função de uma sombra criada pela lateral da caixa. É possível que esta diferença afetou a distribuição do cavar pelos animais HAB, uma vez que estes são fóbicos em relação locais expostos, conforme pode ser observado no desempenho no OF e EPM e também é descrito na literatura (Liebsch et al, 1998). Adicionalmente, B também se trata do quadrante mais central de C1, e mais distante das laterais da caixa, fazendo este um dos locais mais expostos e iluminados de C1. Ratos em geral apresentam tigmotaxia (uma preferência por se manter próximos à paredes (c.f.: Lamprea et al, 2008), sendo esta tendência aumentada nos HABs em comparação a LABs (Liebsch et al, 1998; Salomé et al, 2002). Dessa maneira, foi determinado que a escada fosse movida para uma das laterais da caixa experimental em experimentos subsequentes, visando facilitar o seu uso. Esta mudança também permitirá verificar se o comportamento de cavar se distribuirá de maneira nova, de acordo com o novo local da escada em C2, como seria de se esperar caso a escada tenha obtido controle sobre o comportamento de cavar.

O desempenho de HAB TI e TC no treino de escalar, junto com o comportamento observado durante treino e teste de se esconder embaixo da plataforma em C2, parecem indicar que aspectos ansiogênicos da situação de teste (e.g.: subir em uma plataforma com certa distância do chão) podem ter sido determinantes na diferença de desempenho entre linhagens. Adicionalmente, pode ser que animais HAB necessitassem de um treino mais extensivo de cavar do que animais LAB para adquirir direcionalidade, uma vez que a emissão do comportamento de cavar foi muito menor em HAB do que LAB durante a situação de teste. Por fim, a ocorrência de soluções por pulo para a plataforma em vez do uso da escada, indicou que o uso da mesma estava apresentando um maior custo de

resposta do que esperado, uma vez que o uso da escada deveria ser a resposta mais provável e fácil.

Em função destas questões, mudanças foram propostas à caixa experimental além da relocação da escada mencionada anteriormente. O nível de maravalha em C2 foi aumentado, visando reduzir a distância necessária a ser escalada para atingir C2 e possibilitando o posicionamento da escada com ângulo menos íngreme, algo que torna o uso da escada mais fácil. A menor distância do chão da plataforma também deve ter a função de tornar o subir na plataforma menos ansiogênico para animais HAB, uma vez que é conhecido que alturas são estressantes e induzem liberação de corticosterona em ratos (Degroot et al., 2004). O espaço embaixo da plataforma foi tapado, de maneira que as ratas não pudessem mais se esconder embaixo dela. O treino de cavar também foi reformulado, visando um treino mais lento e desmembrado em menores requisitos, buscando que esse repertório fosse melhor instalado.

Por último, é digno de nota que foi encontrada uma relação entre o estágio estral de alto estrogênio e a ocorrência de solução em HABs, apesar de se tratar de um número pequeno; o mesmo não foi observado em LABs. O estrogênio tem uma função protetiva contra estresse e ansiedade (Jariq et al. 2019), e é possível que o melhor desempenho observado nestes animais tenha sido função de uma redução em ansiedade durante a situação de teste; entretanto, são necessários mais animais neste estágio do ciclo para que essa relação seja confirmada.

## **EXPERIMENTO II**

### **Ajustes à metodologia**

#### **OBJETIVO**

Uma vez que foi verificada uma diferença entre as linhagens LAB e HAB quanto a seu desempenho na tarefa de cavar e escalar, buscamos garantir que essa diferença não fosse simplesmente um artefato metodológico. Para tal, modificações à caixa e treino foram feitas, visando reduzir possíveis aspectos ansiogênicos da situação de teste e treino.

#### **MÉTODO**

##### **A. Animais**

Um total de 10 ratas *Wistar* fêmeas, de cerca de 3 meses de idade, 5 das quais eram da linhagem LAB e 5 de linhagem HAB. Todos os animais foram provenientes do biotério de criação da Universität Regensburg. Os animais foram mantidos em condições iguais às descritas no Experimento I.

##### **B. Equipamento**

Mesmos materiais que descritos nos subitens *Labirinto em Cruz Elevado (EPM)*, *Avaliação do ciclo estral*, *Consequência e Filmagem & Registro* da sessão de Equipamento do Experimento I.

A intensidade da luz na sala de coleta foi reduzida em 10%, de maneira a ficar compatível com a iluminação do período claro dentro do biotério onde os animais eram alojados, uma vez que foi observada esta discrepância.

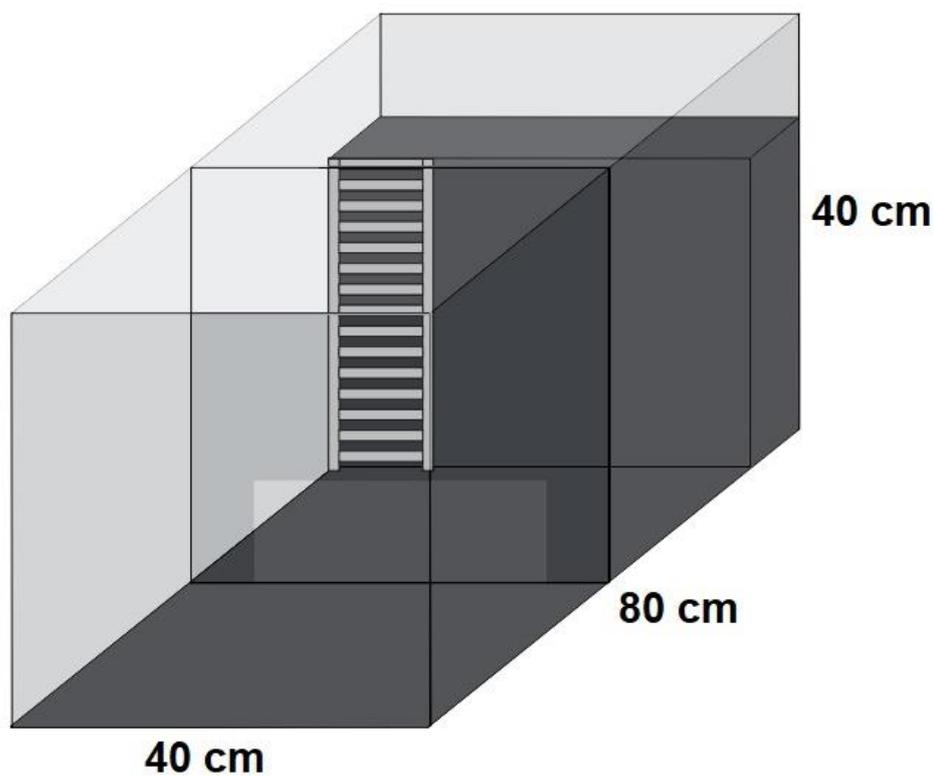
##### *Caixa experimental*

A caixa experimental utilizada no Experimento 1 foi alterada em três quesitos (Figura 19): a) a escada, antes localizada no centro da caixa experimental, foi movida para a lateral esquerda da caixa, junto à parede da mesma; b) a plataforma foi modificada a não haver mais espaço debaixo da mesma, de forma a evitar a concorrência entre o comportamento de resolver o problema e o comportamento de se esconder; c) a quantidade de maravalha colocada na câmara 2 foi aumentado, de

maneira a diminuir a distância da plataforma do chão da caixa experimental; o nível mais alto de maravalha implicou também em inclinação menos íngreme da escada.

**Figura 19**

*Caixa Experimental Modificada*



*Notas:* Caixa Experimental modificada, que foi utilizada nos experimentos em diante. A escada foi movida para a lateral esquerda da caixa e a plataforma modificada de maneira a não haver mais espaço embaixo dela.

#### *Software*

Foram utilizados o programa *Prism 9.1* para elaboração de gráficos e execução de testes estatísticos.

#### **C. Manejo Experimental e limpeza dos equipamentos**

Foi seguido o mesmo protocolo descrito no Experimento I.

#### **D. Procedimento**

Foi mantido o procedimento descrito no item *EPM* da sessão de método do Experimento I, sem alterações.

### *Treino*

#### *Treino ao comedouro*

Foi feito da mesma maneira que descrito no Experimento 1.

#### *Treino Escalar*

O treino foi feito da mesma maneira que descrito no Experimento 1, porém com modificações no equipamento, elencadas anteriormente e uma alteração que pareceu crítica para a facilitação da aprendizagem dos animais HAB. O critério de 'subir na plataforma' foi modificado - antes, o comedouro era localizado de maneira que a rata precisava estar completamente sobre a plataforma (com todas as patas na mesma) para poder acessar a consequência. No presente experimento, mais comedouros foram adicionados à plataforma, e a topografia de estar com as patas frontais sobre a plataforma, pegando a consequência, enquanto as patas traseiras ainda se encontravam na escada, passou a ser considerada válida para critério de acerto durante a sessão. Essa forma de resposta se mostrou mais fácil de ser treinada, especialmente para ratas HAB, que dificilmente sobem completamente na plataforma.

Este treino durou seis sessões ao total.

#### *Treino Cavar*

O treino de cavar foi feito similar ao descrito no Experimento 1, porém de maneira mais lenta. O comportamento almejado foi dividido em unidades mais simples e fáceis, e a exigência a cada sessão foi reduzida, resultando em um maior número de sessões até que o comportamento completo fosse instaurado. Então se, e.g., antes havia exigência de cavar a uma profundidade de 5cm até o fim da segunda sessão de treino, o novo critério para aquela sessão foi de 2cm. O treino foi feito de acordo com a velocidade de aprendizagem média dos animais durante as sessões – a exigência só era aumentada uma vez que a maior parte dos animais de ambas as linhagens já estivessem proficientes no critério anterior. Todas as ratas atingiram o critério final de aprendizagem, que permaneceu o mesmo do Experimento I.

Esta mudança se deu em função da baixa ocorrência do comportamento de cavar durante a sessão teste nos animais HAB TC em comparação aos animais LAB TC. Uma vez que o treino de cavar no Experimento I teve duração de poucas sessões, foi considerado possível que os animais HAB necessitassem de um treino mais extenso para adquirir o PR do que os LAB.

Totalizaram 11 sessões de treino de cavar, contra 5 realizadas no Experimento 1.

As sessões de teste foram conduzidas da mesma forma que descrita no experimento anterior.

A ordem de apresentação de cada etapa do procedimento pode ser vista na figura 20.

## Figura 20

*Desenho Experimental do Experimento II*



*Notas.* Linha do tempo do experimento. 'EPM' se refere ao Labirinto em Cruz Elevado.

### E. Análise dos dados

Foram analisadas as curvas de aprendizagem durante o treino para as duas linhagens, assim como a taxa de resolução no Teste II. As quantidades de reforçadores obtidos durante o treino foram analisadas fazendo uso de ANOVA de medidas repetidas e dois fatores (linhagem e sessão) e teste *pos-hoc* de comparações múltiplas de Holm-Šídák. A quantidade total de reforçadores também foi comparada usando teste T com correção de Welch.

Por fim, a quantidade de reforçadores totais para cada PR ao longo do treino foram comparados usando uma ANOVA de medidas repetidas e dois fatores (PR e Linhagem).

## RESULTADOS

### EPM

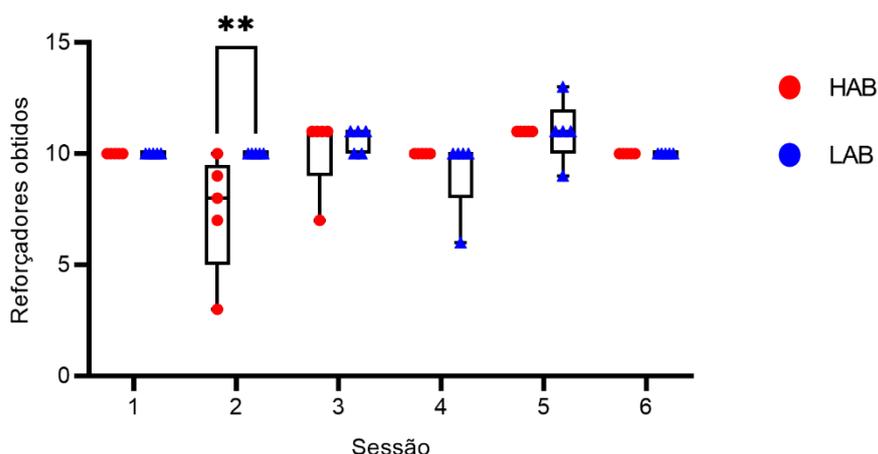
Foram testadas cinco ratas LAB no EPM, com o critério de mínimo de 20% de tempo de sessão passado nos braços abertos. Estes animais ficaram em média 31,35% ( $\pm 1,91$ ) da sessão nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Das cinco ratas HAB testadas, todas passaram 0% da sessão nos braços abertos.

### Treino Escalar

Foram necessárias 6 sessões de treino para instaurar o comportamento de escalar. As ratas de ambos os grupos apresentaram desempenho semelhante, conforme pode ser observado na Figura 21. Uma ANOVA de dois fatores e medidas repetidas com os fatores Linhagem e Sessão entraram interação significativa dos fatores ( $F(5)=3,117$ ,  $p=0,0181$ ), assim como efeito significativo do fator Sessão ( $F(5)=5,53$ ,  $p=0,0006$ ). Teste pos hoc de comparações múltiplas com correção de Holm-Šídák apontaram que a diferença se encontra na segunda sessão ( $p=0,0051$ ). Nesta, LAB atingiram em média 10 reforços, enquanto HAB obtiveram em média 7,4; essa diferença, entretanto, não se faz mais presente nas demais sessões, com ambos os grupos apresentando desempenho idêntico durante a última sessão, com o número máximo de reforços obtido por todos os sujeitos ( $p>0,9999$ ).

**Figura 21**

*Reforçadores obtidos por sessão de treino de escalar, por grupo*



*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de escalar. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

\*\*=  $p=0,0051$

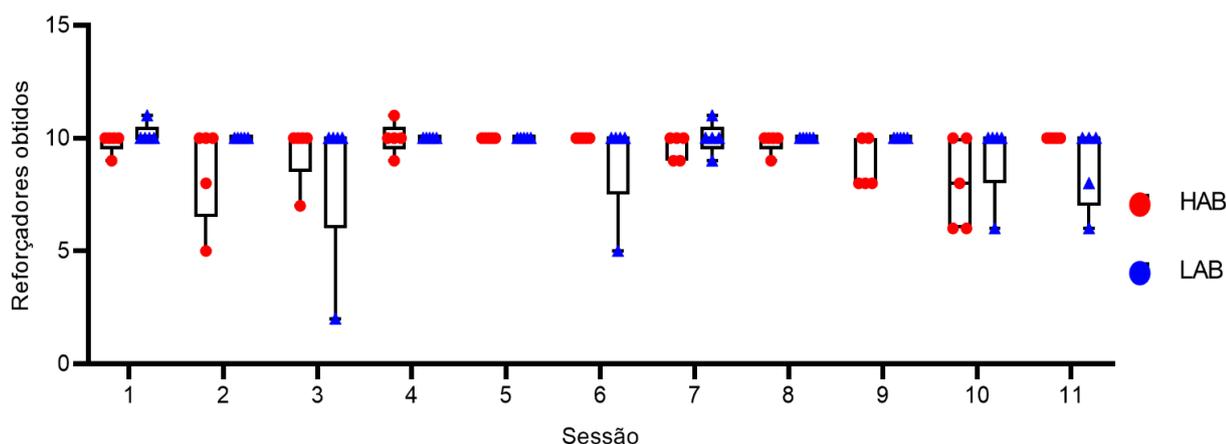
A quantidade total de reforçadores obtidos ao longo do treino para cada PR também foi contabilizada. Animais do grupo LAB obtiveram em média 60,8 ( $\pm 4,39$ ) reforçadores durante o treino de escalar, enquanto animais HAB obtiveram em média 58,60 ( $\pm 3,42$ ). O teste T de Welch não encontrou diferenças significativas entre os reforçadores totais obtidos para cada grupo,  $t(7,456) = 0,8835$ ,  $p = 0,6396$ .

### Treino Cavar

Foram necessárias 11 sessões de treino do repertório de cavar para que o critério de aprendizagem fosse alcançado. Foi efetuada uma ANOVA de dois fatores e medidas repetidas, com a qual não foram observadas diferenças entre as duas linhagens quanto à aquisição do repertório de cavar ( $F(10)=1,295$ ,  $p=0,247$  para interação) (Figura 22).

**Figura 22**

*Reforçadores obtidos por sessão de treino de cavar, por grupo.*



*Notas:* Reforçadores obtidos durante o treino de cavar. Valores individuais são apresentados assim como distribuição do grupo (máximo e mínimo) e média.

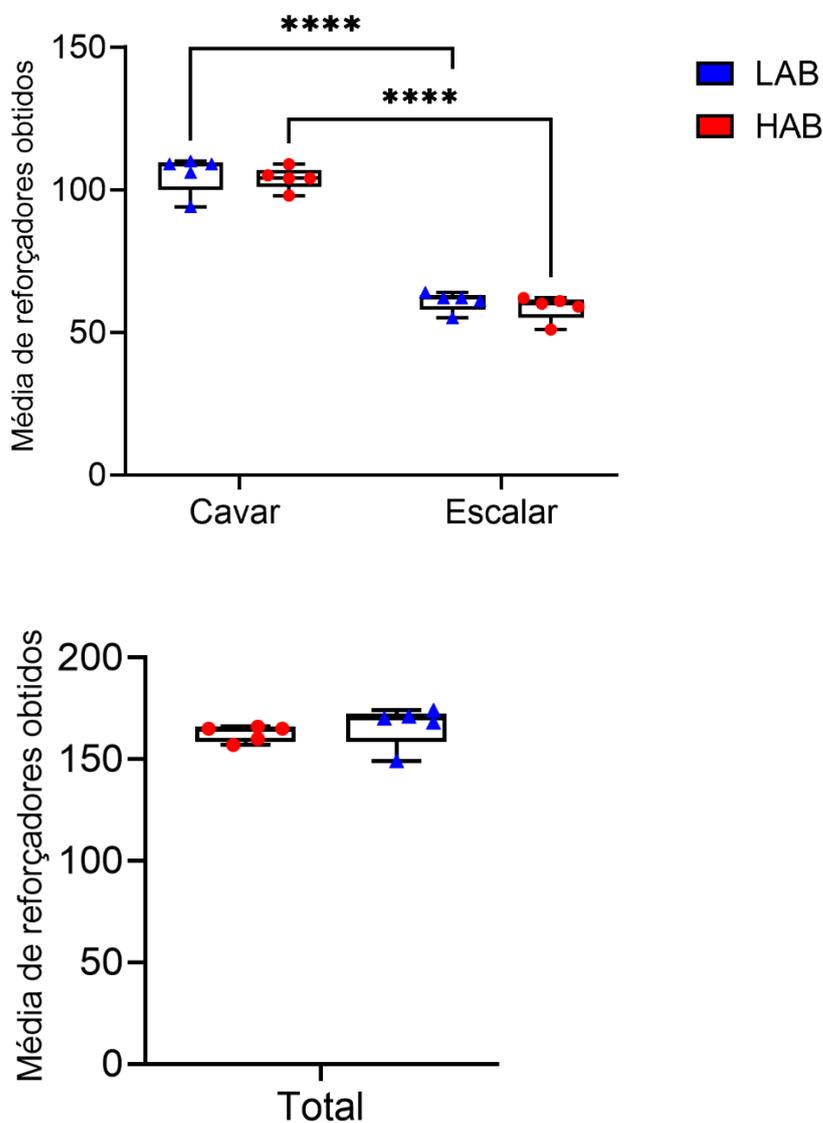
A quantidade de reforçadores obtidos ao longo de todas as sessões para o PR de cavar para animais HAB foi em média de 105,6 ( $\pm 6,65$ ) reforçadores e para os LAB, 104 ( $\pm 3,937$ ). O teste T de Welch não encontrou significância na diferença entre grupos,  $t(6,494) = 0,46$ ,  $p = 0,658$ .

Por último, a quantidade total de reforçadores consumidos ao longo do treino de ambas as PRs foi comparada (Figura 23). Uma ANOVA de dois fatores e medidas repetidas indicou que efeito significativo do fator Treino (cavar ou escalar) ( $F(1)=607,2$ ,

$p < 0,0001$ ), mas não linhagem ( $F(1)0,63$ ,  $p = 0,450$ ) sobre o número de reforçadores obtidos.

**Figura 23**

*Total de reforçadores obtidos para cada PR e ao longo do treino, em média por grupo*



HABs obtiveram em média  $162,6 (\pm 3,91)$  reforçadores ao longo do treino, em comparação com  $166,4 (\pm 9,965)$  das LABs. O teste T de Welch não encontrou diferença entre os grupos ( $t(5,204) = 0,79$ ,  $p = 4,46$ ). O teste de comparações múltiplas com correção de Holm-Šídák, entretanto, revelou diferença entre a quantidade total de reforçadores obtidos no treino de cavar e a quantidade total obtida no treino de escalar, para ambas as linhagens ( $p < 0,0001$  para ambas).

## Teste II

Somente um animal LAB resolveu a situação problema durante a segunda exposição ao teste (Figura 24).

### **Figura 24**

*Desempenho no Teste II.*

#### **Grupo**

LAB						
HAB						

*Notas:* Cada célula colorida representa o desempenho de um sujeito em cada tentativa da fase de Teste. Verde significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada sem retornar para C1, Cinza significa que a rata não cruzou entre C1 e C2.

A rata 887 começou a cavar perto da divisória (no quadrante A) aos 1:32 min de sessão, encontrando a passagem na divisória por volta de 1:48 min (em B), porém não cruzou para o outro lado da caixa. Aos 3:12 min retornou para a abertura e começou a cavar, cruzando aos 3:28 min de sessão; aos 3:49 min, após uma volta por C2, subiu a escada e obteve a consequência na plataforma.

Nos demais animais, em ambas as linhagens, o comportamento de cavar apresentou um padrão diferente do observado no Experimento 1 por animais que resolveram o problema. Em vez de cavarem até uma profundidade suficiente para encontrarem a passagem para C2, os animais apresentaram episódios de cavar curtos e estereotipados, resultando em cavadas superficiais. Dessa maneira, não cruzaram de C1 para C2, e, portanto, não resolveram o problema.

## DISCUSSÃO

No presente experimento buscamos tornar o repertório de escalar menos aversivo para os animais HAB, uma vez que a altura é estressora e aversiva para ratos Wistar em geral (Degroot et al., 2004, entre outros) e HABs especificamente (Liebsch et al, 1998; Henniger et al, 2000; Salomé et al, 2002), e, dessa maneira, igualar a aprendizagem do PR escalar entre as linhagens.

Esse objetivo pareceu ter sido alcançado, uma vez que, diferentemente do Experimento I, aqui a aquisição do repertório de escalar não diferiu significativamente entre linhagens. Somente em uma sessão (a primeira a exigir que os animais subissem na plataforma) foi encontrada diferenças, porém logo na próxima sessão o desempenho de ambos os grupos já se tornou similar novamente. Ao final, os grupos não diferiram quanto ao total de reforçadores obtidos; em conjunto com ambos terem atingido o máximo de reforçadores disponíveis durante a última sessão de treino, ficou sinalizada total aprendizagem do PR escalar pelos animais de ambas as linhagens.

O desempenho durante o treino de cavar também foi compatível para ambas as linhagens, não apresentando diferenças significativas em nenhum ponto. Tomadas juntas, essas evidências indicam que os animais HAB não possuem nenhum déficit de aquisição ou aprendizagem afetando seu desempenho no treino dos PRs, já que ambas as linhagens tiveram desempenhos similares nos treinos, tanto nas versões modificadas de ambos PRs usadas no Experimento II, quanto no treino de cavar no Experimento I.

Esses achados indicam que as diferenças entre LAB e HAB na aprendizagem do PR escalar observadas no Experimento I foram provavelmente oriundas de problemas na metodologia e equipamento. Esses, entretanto, parece terem sido corrigidos satisfatoriamente, no que diz respeito à aquisição dos PRs aqui observada.

Da mesma maneira, a remoção de um espaço embaixo da plataforma removeu a questão de o comportamento de se esconder aparecer em concorrência ao de subir durante o treino, reduzindo a duração das sessões para ambas as linhagens. Esse comportamento também não podia ser emitido durante a resolução, removendo esta fonte de variação no tempo de solução dos animais.

Algum aspecto das modificações efetuadas, entretanto, pareceu ter um efeito deletério sobre a ocorrência de solução durante o teste, uma vez que a quantidade de animais de ambas as linhagens a resolver o problema foi extremamente reduzido em comparação ao Experimento I. Diversos pontos podem ser levantados em relação a

isso. É possível que a mudança da na localização da escada e na plataforma poderiam ter de alguma forma inibido a ocorrência de soluções. Isso parece improvável, uma vez que logo o primeiro elo da resolução não foi emitido – ou seja, os animais não cruzaram de C1 para C2. Ao retornarmos a hipótese da transferência de função dos estímulos colocada no experimento anterior, poderíamos pensar que a explicação seria que o estímulo 'escada' não adquiriu controle sobre o cavar. O treino de escalar, entretanto, ocorreu de maneira fácil para ambas as linhagens, tornando essa explicação improvável, uma vez que as modificações pareceram ter um efeito facilitador na aquisição da PR de escalar. Uma explicação mais provável se encontra ao analisarmos o treino do PR cavar.

Primeiramente, o treino mais extenso do comportamento de cavar resultou em uma assimetria da quantidade de treino e reforçadores obtidos nos diferentes PRs. Embora esses achados não sejam consistentes entre espécies e situações problema, foram observados casos no quais quantidades muito diferentes de treino podem resultar em um efeito negativo sobre a resolução. Neves Filho (2015) observou que pombos que receberam o dobro de treino de um PR do que outro não apresentaram repertório de resolver o problema de deslocamento de caixa. Já com macacos-prego (Neves Filho, 2010) e corvos (Neves Filho, Knaus e Taylor, 2019), diferenças na quantidade de treino dos PR não pareceram ter um efeito negativo sobre a ocorrência de solução.

Além da questão da assimetria, a labilidade do comportamento de cavar pode ter sido afetada por um treino longo demais. O excesso de treino pode levar a um comportamento rígido ou estereotipado (Bar & Klavir, 2021) e insensível à mudanças ambientais. Segundo a hipótese da generalização funcional (Epstein, 1985), o PR cavar deve ser flexível, uma vez que haveria mudança no controle de estímulos desse comportamento, necessária para que a emergência da solução possa ocorrer. Além disso, topograficamente, a resposta também deve mudar, de um cavar direcionado para baixo, para um cavar para baixo e para a frente, o que não foi observado neste experimento, em contraste com o Experimento I, no qual animais frequentemente cavavam já “contra” a divisória. Durante o teste no presente experimento, os episódios de cavar observados também foram mais curtos e superficiais, aproximando à estereotipia, em comparação ao Experimento 1; essa menor persistência no comportamento também pode estar envolvida na menor quantidade de resoluções observadas.

Tomadas todas juntas, as evidências indicam que as modificações no treino de cavar levaram ao mal desempenho observado no Experimento 2, enquanto mudanças efetuadas em C2 tiveram um efeito facilitador na aprendizagem do PR escalar

## EXPERIMENTO 3

### Manipulações hormonais

#### OBJETIVO

O presente experimento teve como objetivo averiguar o papel da corticosterona circulante no desempenho de ratas de diferentes perfis quanto a ansiedade de traço no teste de cavar e escalar. Para tal, animais de três linhagens - HAB, LAB e animais Wistar não selecionados pelo perfil ansioso (NAB) - receberam três tratamentos antes da sessão de teste - veículo, corticosterona a 10 mg/kg, dose com demonstrado efeito comportamental (Jacobson-Pick e Richter-Levin, 2010) ou metirapona, um bloqueador da síntese e soltura de corticosterona, a 50 mg/kg.

#### MÉTODO

##### A. Animais

Foram utilizados 55 animais, entre 4 e 6 meses de idade, todas fêmeas. Dessas, 23 pertenciam à linhagem HAB, 11 à linhagem LAB e 21 NAB. Animais LAB e HAB foram oriundos do laboratório de criação da Universität Regensburg, enquanto as ratas NAB foram adquiridas do *Charles Rivers Laboratories* em Sulzfeld, na Alemanha.

Os animais das linhagens NAB e HAB foram divididos em três grupos, de acordo com o tratamento recebido: Corticosterona (CORT), Metirapona (MET) e Veículo (VEI). Já os animais da linhagem LAB receberam somente dois tratamentos, Corticosterona e Veículo<sup>7</sup>.

##### B. Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico foi aplicado antes da sessão de Teste, de acordo com as especificações de cada droga. Animais CORT receberam 10 mg/kg de corticosterona intraperitoneal (i.p.), 30 min antes da sessão de Teste. Foi utilizado um complexo de corticosterona hidrossolúvel (concentração 66,7%), diluído em solução salina. Já os animais MET receberam 50 mg/kg de metirapona i.p., 90 min antes da sessão de Teste II. A metirapona (concentração 96%) foi primeiramente diluída em Propilenoglicol (40% da solução em volume) e então em solução salina (60% da solução em volume). Ambas as drogas foram adquiridas do laboratório Sigma-Aldrich Chemistry.

Animais VEI receberam veículo i.p., em volume de 1 ml/kg, 60 mins antes da sessão de Teste.

### C. Equipamento

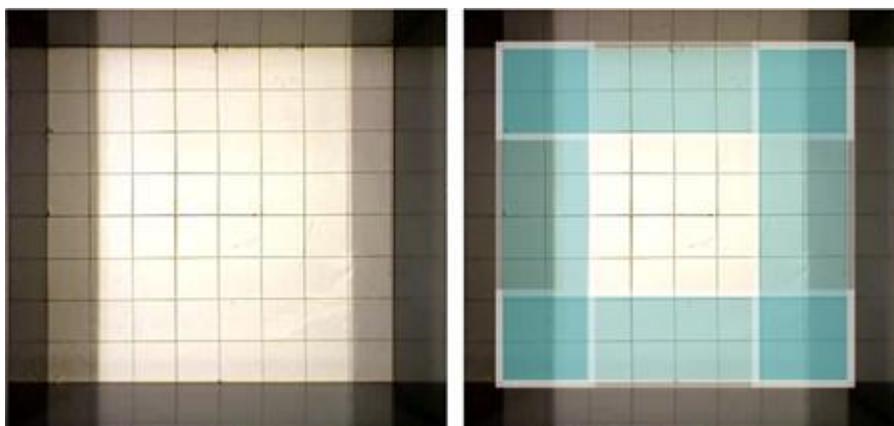
Foram utilizados os mesmos itens descritos nos tópicos *Labirinto em Cruz Elevado (EPM)*, *Avaliação do Ciclo Estral*, *Consequência*, *Filmagem & Registro* e *Software* do Experimento I e em *Caixa experimental* no Experimento II.

#### *Campo aberto*

O mesmo campo aberto utilizado anteriormente, porém sem a divisória, de maneira que o campo ficou com dimensões de 80 x 80 x 40 cm. Foi também trocado o fundo do aparato, por um fundo branco com uma malha quadriculada em preto, cada quadrado medindo 10 x 10 cm (Figura 25). Este fundo foi utilizado para possibilitar a análise manual da ambulação, a partir da quantidade cruzamentos entre quadrantes.

### Figura 25

#### *Campo aberto*



*Notas:* Campo aberto (80 x 80 x 40 cm), com fundo de malha quadriculada (com quadros de 10 x 10 cm). Na figura à direita, as porções azuis do campo representam a periferia, e a parte branca no meio, o centro.

### D. Manejo Experimental e limpeza dos equipamentos

Idênticos aos descritos anteriormente. Adicionalmente, os animais foram manipulados em simulação de injeção por três dias antes do dia do Teste II. Para tal, o animal era colocado sobre a bancada, seguro pela base da cauda, e um pano limpo era

colocado sobre seu dorso e cabeça. A experimentadora então continha a rata pelo dorso, posicionando-a com a face ventral para cima, e pressionava a ponta de uma caneta atóxica fina no local no qual a injeção seria aplicada, segurando por três segundos. Com essa manipulação, no dia de teste, as injeções puderam ser aplicadas com nenhum incidente e poucas manifestações de desconforto por parte dos animais.

### **E. Procedimento**

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no Experimento I nas sessões *EPM* e *Avaliação do Ciclo Estraf<sup>o</sup>* do procedimento. O *Teste I* e *Teste II* foram executados da mesma maneira descrita no Experimento II. Os animais receberam tratamento farmacológico de acordo com o descrito anteriormente, antes do Teste II.

#### *Campo Aberto*

O animal foi manipulado e colocado dentro do campo conforme descrito no Experimento I. Entretanto, foi utilizado o campo aberto completo (80 x 80 x 40 cm) e não dividido em dois, de maneira a ser possível uma medida de ansiedade dos animais a partir da relação entre o tempo total e o tempo passado na porção central do campo.

#### *Treino*

A partir dos resultados dos experimentos anteriores, novas mudanças foram feitas ao treino, que foram validadas em experimento piloto (dados exibidos adiante em conjunto com os demais). Elas serão descritas a seguir.

Primeiramente, a quantidade de sessões para cada PR foi igualada, resultando em um treino simétrico. Foram planejadas duas sessões de treino ao comedouro, conforme descritas no Experimento I, e seis sessões de treino para cada PR, a partir do desempenho observado no treino de cavar no Experimento I e do desempenho no treino de Escalar no Experimento II. Também foi decidido que animais que apresentassem desempenho recorrentemente muito aquém dos demais nas primeiras quatro sessões de treino seriam removidos do experimento. Ao total, duas ratas HAB e duas ratas NAB foram removidas, em função de desinteresse no alimento utilizado como consequência, no caso das HABs, e a recorrência do comportamento de salto para fora da caixa experimental durante a sessão de treino, no caso das NABs.

Toda sessão teve como critério o consumo de 10 consequências ou a passagem de 10 min. Quando possível, mais de uma sessão de treino foi conduzida por dia.

Na Tabela 4, pode ser visto o esquema geral de treino, com o dia no qual cada sessão ocorreu, qual comportamento foi treinado, e como cada sessão de treino foi

organizada, em relação ao critério de aprendizagem e quantidade e localização dos comedouros durante o treino.

Durante o treino de escalar, três tampas comedouros foram afixadas à escada e quatro à plataforma. Comedouros na plataforma possuíam sempre duas consequências cada, que, se consumidas, eram repostas; o comportamento de subir na plataforma usando a escada era tratado como uma tentativa correta desde a primeira sessão, sendo, portanto, sempre consequenciado positivamente e contado na contabilização de respostas necessárias para atingir o critério. Já os comedouros afixados à escada possuíam quantidades variadas de consequências de acordo com a sessão de treino e foram removidos progressivamente ao longo do treino, de maneira que será descrita adiante.

Para o treino da PR cavar, quantidades crescentes de maravalha foram adicionadas a caixa com cada sessão, começando com 5cm de profundidade na primeira sessão. Conforme a profundidade da maravalha era aumentada, os comedouros eram enterrados mais fundo. As posições pseudoaleatórias nas quais os comedouros eram colocados na caixa experimental foram próximas para todos os indivíduos; a mesma sequência de posições e locais não eram repetidas em sessões subsequentes, visando evitar a aprendizagem por posição ou ordem.

Ao final do treino, o critério de aprendizagem era encontrar o comedouro enterrado (com somente um comedouro na caixa) em profundidade de cerca de 15cm.

**Tabela 4***Esquemática das sessões de treino*

<b>Comportamento [sessão]</b>	<b>Descrição e critério</b>
Escalar [1]	Três comedouros presentes na escada. O primeiro contia três consequências, o segundo, quatro e, o mais alto e próximo da plataforma, também quatro.
Escalar [2]	Três comedouros na escada; duas consequências no inferior, três no intermediário e quatro no superior.
Escalar [3]	Dois comedouros na escada, sendo o mais inferior o removido. Três consequências presentes no comedouro mais inferior remanescente e 4 no superior.
Escalar [4]	Um comedouro na escada, ficando somente o mais próximo à plataforma, com três consequências.
Escalar [5]	Um comedouro na escada, com 2 consequências.
Escalar [6]	Todos os comedouros na escada removidos. A rata deve atingir a plataforma, usando as escadas, e consumir a consequência, cinco vezes.
Cavar [1]	Maravalha com 5 cm de profundidade. 4 comedouros colocados sobre a maravalha.
Cavar [2]	4 comedouros, levemente cobertos de maravalha.
Cavar [3]	Maravalha com 10 cm de profundidade. 4 comedouros enterrados próximos a superfície.
Cavar [4]	Maravalha com 15 cm de profundidade. 3 comedouros. Deve cavar mínimo de cerca de 5 cm.
Cavar [5]	Três comedouros. Deve achar comedouro a cerca de 10 cm de profundidade.
Cavar [6]	Animal achar comedouro enterrado a 15cm e consumir a consequência, com somente um comedor presente na caixa.

*Notas:* Esquema do treino das PR. Entre colchetes [ ] está o número da sessão de treino. À direita, está a descrição da disposição da caixa experimental e comedouros durante cada sessão.

### Testes I-II

Os testes foram executados da mesma maneira que o Teste do Experimento 2.

A ordem dos procedimentos pode ser visto da Figura 26.

**Figura 26**

*Ordem de procedimentos*



*Notas:* Linha do tempo do experimento. Injeções ocorriam antes da sessão de teste, a depender do tratamento administrado: corticosterona era administrada 1h antes do teste; metirapona, 1h30 e o veículo, 1h antes.

### **F. Critérios de exclusão**

Os mesmos descritos nos Experimento 1 e 2.

### **G. Análise de dados**

Foi efetuado o mesmo tratamento e análise de dados que no Experimento 1, em relação ao comportamento durante o teste. Para avaliação da ansiedade, foi contabilizado o tempo passado na porção central do OF, assim como o tempo que o animal passou ereto e a distância percorrida. Foi considerado como porção central do campo um quadrado de 40 x 40 cm em seu meio, enquanto os 20 cm juntos à parede foram determinados como periferia (Figura xx, direita, em azul). Com uso do programa BORIS, também foram registradas ocorrências de grooming, evacuação e mudanças de postura entre prono e ereto durante a sessão de campo aberto. Estes dados foram analisados com ANOVAs de Brown-Forsythe e pos-hoc de Dunnett (velocidade e tempo ereto) e o tempo passado na porção central por um teste de Kruskal-Wallis e pos-hoc de Dunn.

## RESULTADOS

### *EPM*

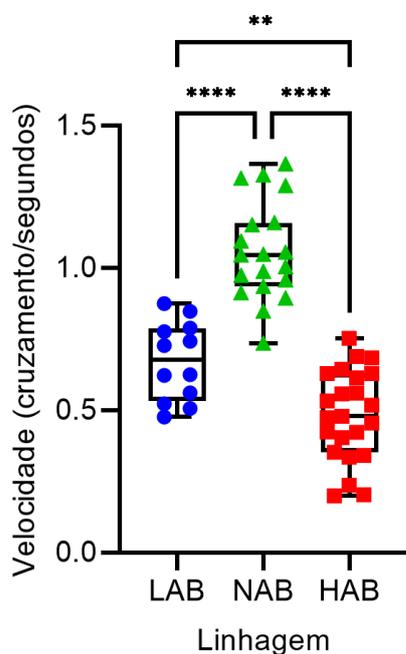
Ratas LAB (n=15) foram testados no EPM, com média de 31,442% ( $\pm 7,387$ ) do tempo passado nos braços abertos do labirinto. Já ratas HAB (n=31) apresentaram média de 1,639% ( $\pm 2,593$ ) da sessão nos braços abertos.

### *OF*

A velocidade (cruzamentos por tempo de sessão) das ratas no OF foi diferente entre as três linhagens testadas, conforme uma ANOVA de Brown-Forsythe revelou ( $F(2)=71,24$ ;  $p<0,0001$ ). Animais HAB apresentaram uma velocidade média de 0,48 cruzamentos/s ( $\pm 0,16$ ), sendo este valor 1,058% ( $\pm 0,17$ ) para o grupo NAB e 0,673% ( $\pm 0,134$ ) para LAB. Teste pos-hoc de Dunnett revelou que a locomoção foi significativamente diferente entre LAB e HAB ( $p=0,004$ ), LAB e NAB ( $p<0,0001$ ) e NAB e HAB ( $p<0,0001$ ) (Figura 27).

**Figura 27**

*Velocidade OF*



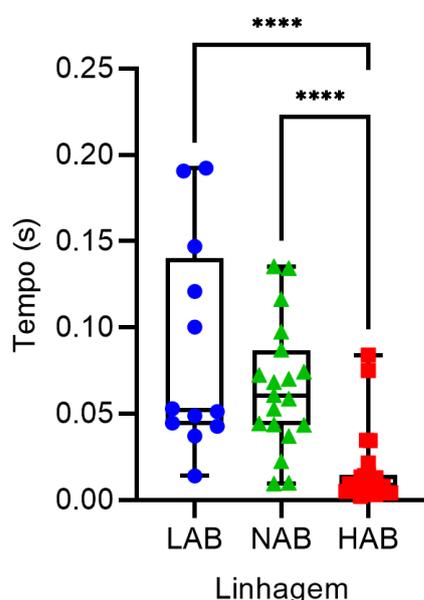
*Notas:* Número de cruzamentos entre quadrantes no campo aberto dividido pela duração total da sessão (s). Valores individuais e de grupo (mínimo, máximo e média) estão representados.

\*\*  $p=0,004$ ; \*\*\* $p<0,001$

O tempo passado na porção central também apresentou diferenças significativas entre linhagens, segundo um teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica) ( $H(3)=26,08$ ;  $p<0,001$ ); pós-hoc de Dunn revelou diferenças significativas entre HAB e LAB ( $p<0,001$ ) e HAB e NAB ( $p<0,001$ ), mas não NAB e LAB ( $p>0,999$ ). Os animais HAB passaram em média  $0,017 (\pm 0,021)$  s na porção central, contra  $0,651 (\pm 0,04)$  s para NAB e  $0,09 (\pm 0,62)$  s para LAB (figura 28).

**Figura 28**

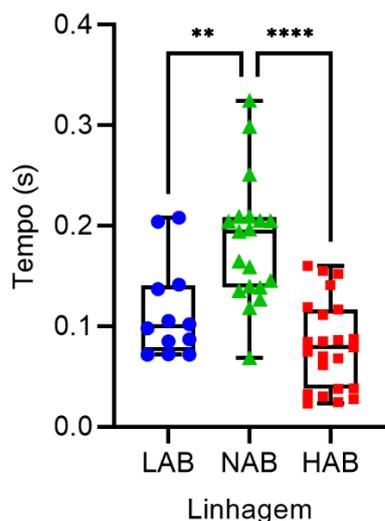
*Tempo Porção central (OF)*



*Notas:* Tempo total (s) que o animal passou na porção central do campo aberto. Valores individuais e de grupo (mínimo, máximo e média) estão representados.

\*\*\*\*  $p<0,001$

Por último, a quantidade de tempo passada em postura ereta durante o teste também diferiu entre as linhagens, de acordo com teste de Brown-Forsythe ( $F(2)=20,33$ ;  $p<0,001$ ). Um pós-hoc de Dunnett revelou diferença entre HAB e NAB ( $p<0,001$ ) e LAB e NAB ( $p=0,006$ ), mas não HAB e LAB ( $p=0,1480$ ). Ratas HAB apresentaram média de  $0,08 (\pm 0,04)$  s eretas, enquanto NAB passaram média  $0,18 (\pm 0,06)$  s e LAB  $0,12 (\pm 0,05)$  s nesta postura (figura 29).

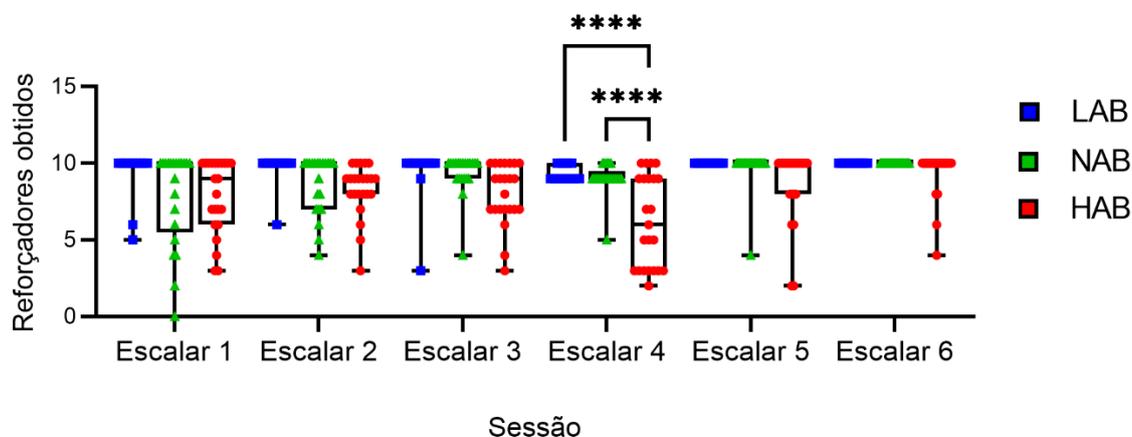
**Figura 29***Tempo ereto (OF)*

*Notas:* Tempo total (s) que o animal passou em posição ereta durante o teste de campo aberto. Valores individuais e de grupo (mínimo, máximo e média) estão representados.

\*\*  $p=0,006$ ; \*\*\*\*  $p<0,001$

### Treino Escalar

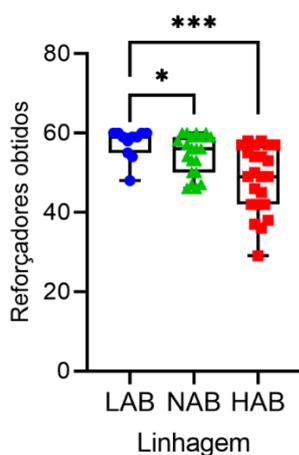
A quantidade de reforçadores por sessão para cada linhagem foi comparada com o uso de uma ANOVA de medidas repetidas e dois fatores (Linhagem e Sessão), que apontou interação entre os fatores ( $F(10)=2,376$ ;  $p=0,011$ ), assim como um efeito de sessão ( $F(5)=2,376$ ,  $p<0,001$ ) e de linhagem ( $F(2)=8,867$ ,  $p<0,001$ ). Comparações múltiplas com correção de Holm-Šídák revelaram que essa diferença se deu em função do desempenho na quarta sessão, na qual HAB diferiu significativamente de LAB e de NAB ( $p<0,001$  para ambas as comparações). Os animais HAB obtiveram somente 6, 217 ( $\pm 2,95$ ) reforçadores na quarta sessão, em comparação com 9,36 ( $\pm 0,51$ ) de LAB e 9,05 ( $\pm 1,31$ ) de NAB. Essa diferença, entretanto, não é observada nas sessões seguintes (Figura 30).

**Figura 30***Escalar*

*Notas:* Número de reforçadores obtidos por sessão de treino de escalar. Valores individuais e de grupo (mínimo, máximo e média) são exibidos.

\*\*\*\*= $p < 0.001$

Foi comparada a quantidade total de reforçadores recebidos durante o treino de escalar (figura 31), por meio de uma ANOVA de Kruskal-Wallis ( $H(3)15,40$ ;  $p < 0,001$ ). Um pos-hoc de Dunn, corrigido, revelou que o desempenho inferior dos animais HAB ocasionou que recebessem menos reforçadores do que as ratas das demais linhagens (HAB v. LAB,  $p > 0,001$ ; HAB v. NAB,  $p = 0,027$ ; NAB v. LAB,  $p = 0,361$ ). HABs tiveram média de 48,43 ( $\pm 8,31$ ) reforçadores, enquanto NAB obtiveram em média 57,45 ( $\pm 3,75$ ) e LABs 54,57 ( $\pm 5,05$ ).

**Figura 31***Reforçadores – Escalar*

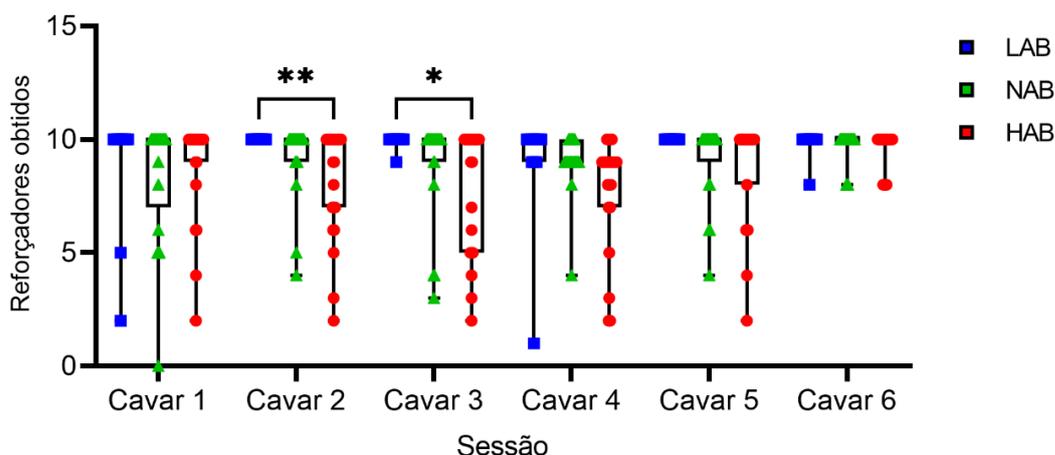
*Notas:* \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p = 0,028$

### Treino Cavar

O desempenho no treino de cavar foi comparado por meio de uma ANOVA de dois fatores e medidas repetidas, com fatores Sessão e Linhagem, teve efeito significativo de Sessão ( $F(5)=3,105$ ;  $p=0,018$ ). Comparações múltiplas com correção de Holm-Šídák indicou que a diferença se encontrou segunda e terceira sessão, nas quais LABs e HABs apresentaram diferença ( $p=0,006$  e  $p=0,011$ , respectivamente). HABs tiveram média de  $8,217 (\pm 2,43)$  na sessão 2 e  $8,043 (\pm 2,72)$  na sessão 3, em comparação a 10 e  $9,909 (\pm 0,30)$ , respectivamente, para LAB e  $9,238 (\pm 1,67)$  e  $8,905 (\pm 2,26)$  para NAB. Novamente essa diferença não se mostra mais presente ao final do treino (figura 32).

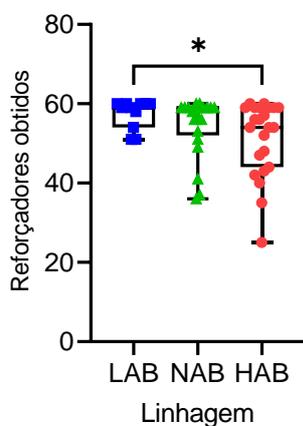
**Figura 32**

*Cavar*



*Notas:* Número de reforçadores obtidos por sessão de treino de cavar. Valores individuais e de grupo (mínimo, máximo e média) são exibidos.

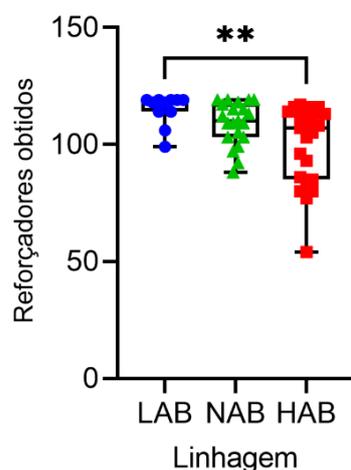
LAB e HAB obtiveram em média  $51,35 (\pm 9,364)$  e  $57,45 (\pm 3,643)$  reforçadores ao longo do treino de cavar, respectivamente. Já NAB tiveram em média  $54,52 (\pm 7,554)$  reforçadores. Um teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis, com fatores Sessão e Linhagem, não encontrou diferença entre grupos quanto aos reforçadores obtidos durante a sessão. Comparações múltiplas de Dunn, entretanto, apontaram que HAB e LAB diferiram quanto ao cavar ( $p=0,048$ ), mas não encontraram diferenças entre as demais comparações (HAB v. NAB,  $p=0,72$ ; LAB v. NAB,  $p=0,465$ ) (Figura 33).

**Figura 33***Reforçadores – Cavar*

Notas: Quantidade total de reforçadores obtidos durante o treino de cavar, por linhagem.

\*= $p=0,0477$

A comparação da quantidade total de reforçadores obtidos ao longo de ambos os treinos, por meio de uma ANOVA de Kruskal-Wallis, revelaram que houveram diferenças entre linhagens ( $H(2)=12,50$ ,  $p=0,002$ ); de acordo com o teste de Dunnett, HAB, com média de  $99,74 (\pm 16,86)$  reforçadores, obtiveram uma quantidade significativamente menor de reforçadores do que LAB ( $p=0,002$ ), com  $114,9 (\pm 6,61)$  reforçadores. NAB, novamente, não se diferenciou das demais linhagens, com  $109 (\pm 9,23)$  reforçadores médios totais (figura 34).

**Figura 34***Reforçadores – Totais*

Notas: \* $p=0,002$

## Teste

Dos 26 animais do subgrupo VEI, quatro (66,67%) animais do grupo LAB, cinco (71,42%) do NAB e três (33,33%) do grupo HAB resolveram o teste. Do subgrupo CORT (n=17), quatro (66,67%) do grupo LAB, cinco (83,33%) do grupo NAB e 0 (0%) do grupo HAB resolveram o teste. Por último, do subgrupo MET (n=17), um (11,11%) animal do grupo HAB e dois (25%) do grupo NAB apresentaram solução (Figura 35).

**Figura 35**

### Desempenho

#### Grupo

LAB VEI (n=6) (80%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
LAB CORT (n=6) (80%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NAB MET (n=8) (25%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NAB VEI (n=7) (85,7%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
NAB CORT (n=6) (83,3%)	*	■	■	■	■	■	■	■	■
HAB MET (n=9) (11,11%)	*	■	■	■	■	■	■	■	■
HAB VEI (n=9) (33,3%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HAB CORT (n=5) (0%)	■	■	■	■	■	■	■	■	■

*Notas:* Resultados do Teste II. Cada célula colorida representa o desempenho de um sujeito no teste. Verde significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada sem retornar para C1, Amarelo significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada, porém retornou para C1 antes de subir a escada, Vermelho significa o animal cruzou para C1 e pulou para cima da plataforma, e Cinza significa que o animal não cruzou de C1 para C2. A presença de \* na célula indica que o animal apresentou comportamento de subir parcialmente na escada e descer, antes de subir até acessar a plataforma.

Foi feito um teste de  $X^2$  entre o número de ocorrências de soluções para as diferentes linhagens, relevando que houve diferença entre estas ( $X^2(2)=11,95$ ,  $p=0,003$ ). Em comparações intra linhagem, LAB VEI e LAB CORT foram comparados por um teste exato de Fischer, que indicou que não houve diferença entre estas. Para as linhagens NAB e HAB, foram feitos testes de  $X^2$  para tendência, organizados de acordo com o nível esperado de CORT sérica (ou seja, em ordem do subgrupo MET primeiro, então o grupo VEI e por último o grupo CORT), para cada uma das linhagens. O teste para HAB não encontrou tendência ( $p=0,826$ ), mas o teste para NAB sim ( $X^2(1)=5,515$ ,  $p=0,019$ ), indicando uma correlação inversa entre o nível de CORT e a ocorrência de solução para esta linhagem.

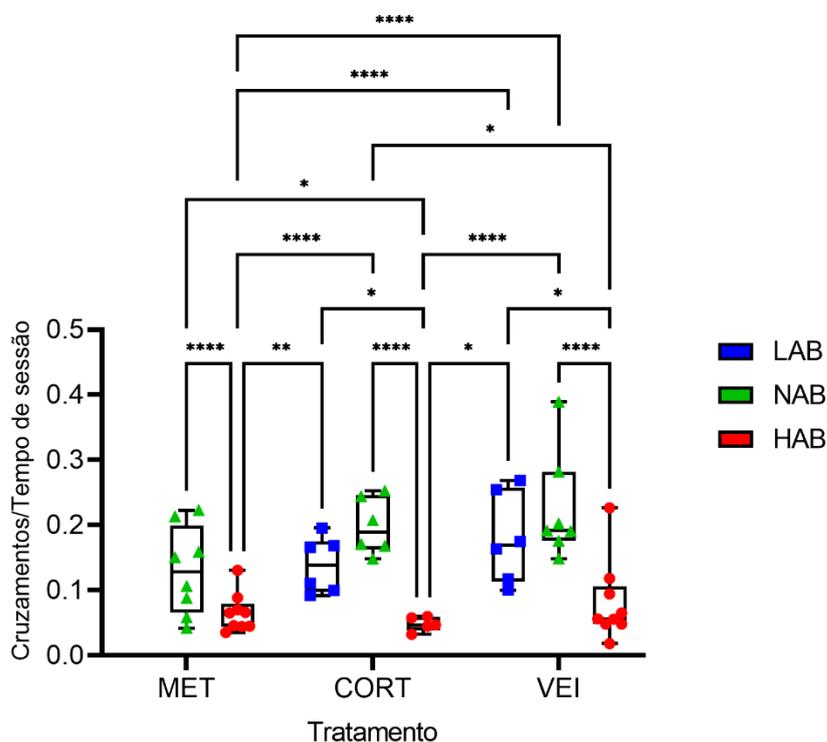
Dos animais que apresentaram solução (n=24), vinte e dois (91,67%) apresentaram a topografia esperada: cavar em frente à divisória, encontrar a passagem, cruzar de C1 para C2, subir a escada em C2 e acessar o reforçador. Todas apresentaram o comportamento de investigar o ambiente novo de C2, dando voltas e farejando, entre acessar C2 e subir a escada para a plataforma. Animais que retornaram para C1 antes de subir a plataforma ou que acessaram a plataforma pulando (i.e. não utilizando as escadas) tiveram a sua solução considerada como “não recombinaiva” (n=3), porém foi considerada como solução.

### Comportamento durante o teste

A velocidade de locomoção durante a sessão de teste (Figura 3.10) variou de acordo com tratamento, conforme revelou uma ANOVA de dois fatores ( $F(2)=3,995$ ,  $p=0,027$ ), e linhagem ( $F(1)=47,45$ ,  $p<0,001$ ). Comparações múltiplas com correção de Holm-Šidák indicaram diferenças entre grupos (figura 36).

**Figura 36**

*Velocidade*



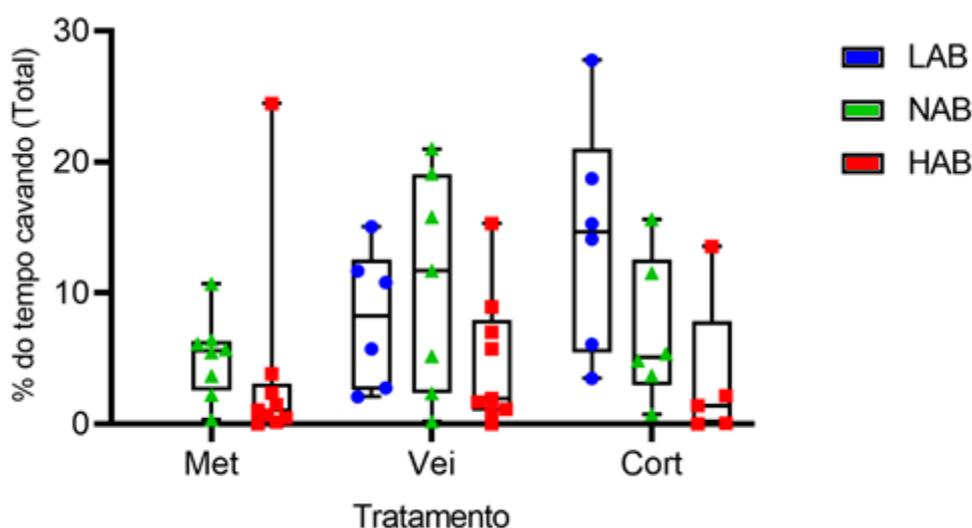
*Notas:* Velocidade (número de cruzamento entre áreas pelo tempo de sessão) durante a sessão de teste. Valores individuais e de grupo são apresentados. \*= $p=0,013$ , \*\*= $p=0,003$ , \*\*\*\*= $P<0,001$

De maneira geral, NAB e LAB apresentaram maior velocidade do que animais HAB, independente do tratamento. LAB VEI tiveram velocidade média de  $0,18 \pm 0,07$  cruzamentos/s, enquanto LB CORT apresentaram  $0,14 (\pm 0,04)$  cruzamentos/s. HAB VEI por sua vez apresentou velocidade média de  $0,07 (\pm 0,06)$ , em comparação a  $0,05 (\pm 0,01)$  de HAB CORT e  $0,066 (\pm 0,03)$  de HAB MET. NAB, enquanto isso, apresentou velocidades de  $0,23 (\pm 0,083)$  para NAB VEI,  $0,198 (\pm 0,043)$  para NAB CORT e  $0,13 (\pm 0,07)$  em NAB MET.

Foi analisado também o comportamento de cavar dos animais durante o teste, quanto a sua duração e local (quadrante de C1 assim como se o animal estava em frente à divisória entre C1 e C2 ou não). A duração do cavar foi convertida em porcentagem do tempo de sessão, e calculada a média para cada grupo e quadrante (Figura 3.11). LABVEI passaram em média  $8,02\% (\pm 5,27)$  do tempo de sessão cavando, em comparação a  $14,24\% (\pm 8,79)$  de LAB GC. NABVEI teve média de  $10,75\% (\pm 8,31)$  do tempo cavando, NAB CORT  $6,96\% (\pm 5,51)$  e NAB GM, por sua vez, teve média de  $5,07\% (\pm 3,11)$ . Por último, HABVEI teve média de  $4,74\% (\pm 5,03)$ , HAB CORT  $3,34\% (\pm 5,73)$  e HAB MET  $3,84\% (\pm 7,83)$ . Uma ANOVA de dois fatores (Linhagem e Tratamento) revelou que o fator linhagem apresentou significância para este desempenho ( $F(2)=3,415$ ,  $p=0,040$ ), mas as diferenças entre os grupos nas comparações múltiplas não foram significativas.

**Figura 37**

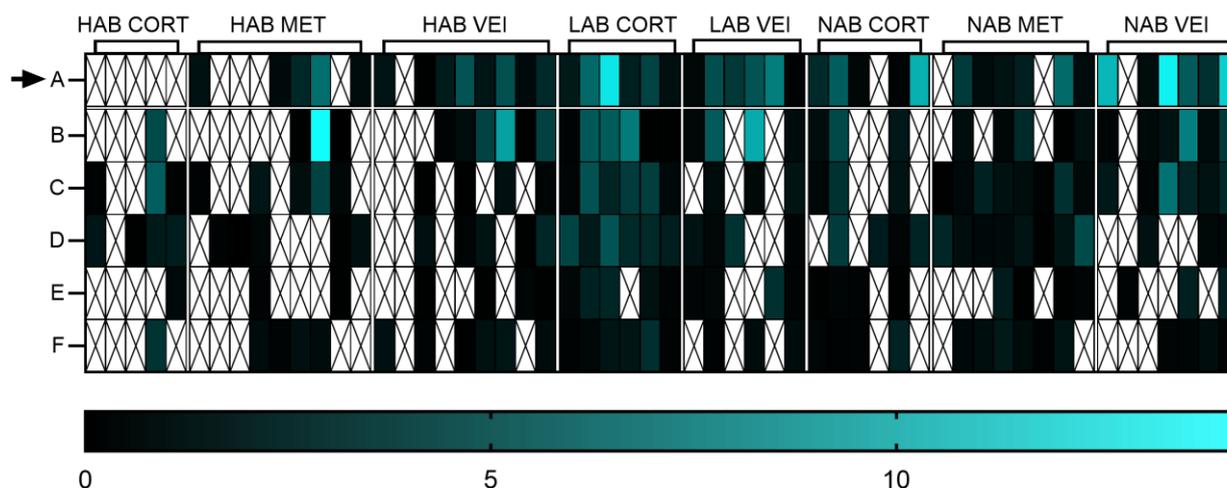
*Tempo cavando*



A distribuição do cavar (calculado como a porcentagem tempo passado cavando em cada área sobre o tempo total de sessão) pelas áreas de C1 não foi uniforme (Figura 38). Foi feita uma ANOVA de dois fatores e medidas repetidas com os fatores Local e Grupo para investigar esta diferença, e foi encontrada interação entre os fatores Área e Grupo ( $F(35)=1,56$ ,  $p=0,030$ ), assim como efeito de Área ( $F(2,295)=9,34$ ,  $p=0,0001$ ).

**Figura 38**

*Gráfico de cores do cavar em C1 durante sessão de teste*

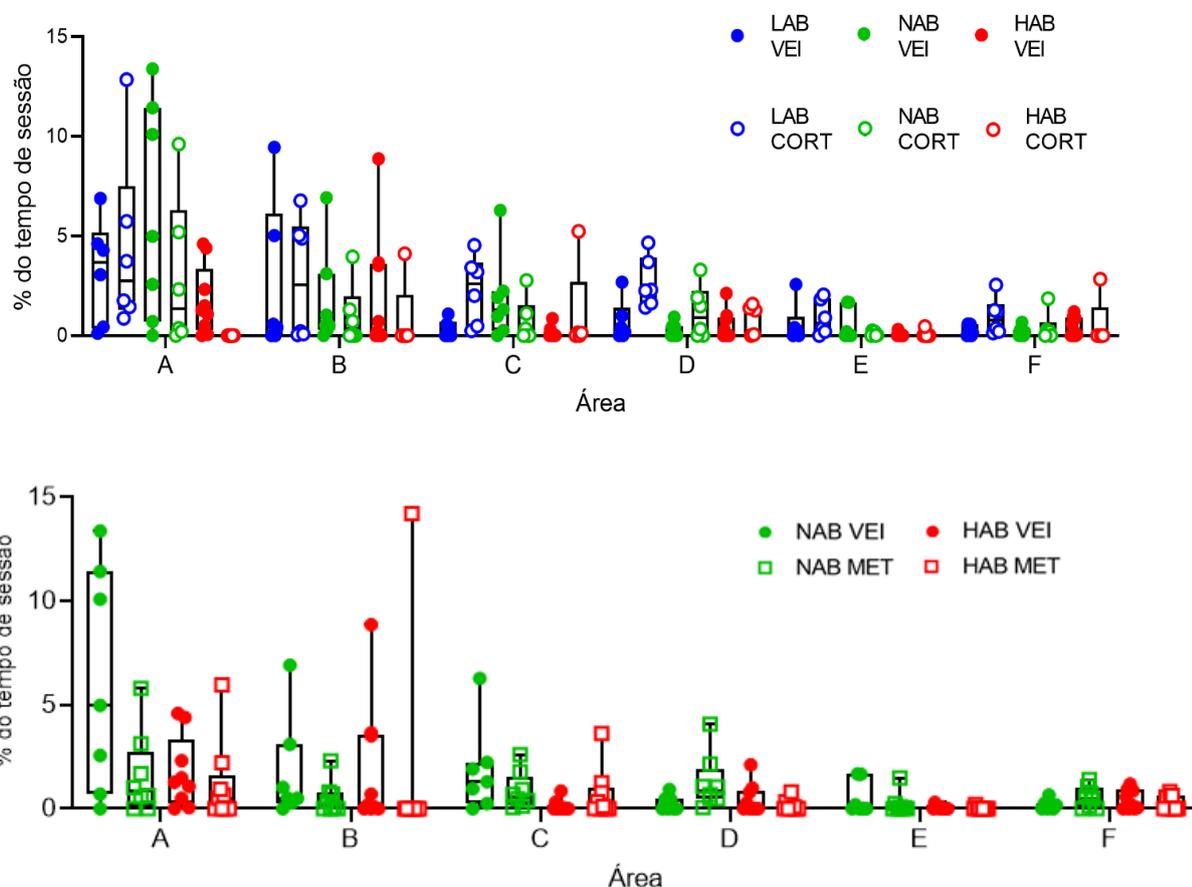


*Notas:* Mapa de cores do comportamento de cavar em C1 durante a sessão de teste. As cores representam a porcentagem do tempo de sessão que cada animal passou cavando aquela área. Cores próximas do preto se aproximam de zero, enquanto cores próximas do turquesa indicam maior tempo passado cavando (máximo de 23.63% da sessão). Cada linha representa um animal, e cada coluna, uma das áreas de C1. Células com X indicam que não houve comportamento de cavar naquela área para aquele animal. A seta em B indica que este era a área diretamente em frente à escada localizada em C2.

O teste pos-hoc de Tukey revelou que o cavar em A (média de  $2,598\%[\pm 3,427]$ ), diferiu de em C ((média= $0,949\%[\pm 1,435]$ ,  $p=0,002$ ), D ( $0,876\%[\pm 1,139]$ ,  $p=0,005$ ), E ( $0,284\%[\pm 0,591]$ ;  $p<0,001$ ) e F ( $0,432[\pm 0,623]$ ;  $p<0,001$ ). Já cavar em B (média= $1,615\pm [2,928]$ ) apresentou diferença do responder em E ( $p=0,010$ ) e F ( $p=0,019$ ), assim como C (E:  $p=0,0092$ ; F:  $p=0,02$ ) e D (E:  $p=0,002$ ; F:  $p=0,0496$ ) (Figura 39). A e B não tiveram valores significativamente diferentes ( $p=0,614$ ).

Figura 39

Distribuição do cavar



Notas: Tempo de sessão (%) passado cavando em cada área de C1. Símbolos azuis se tratam de animais LAB, vermelhos HAB e verdes NAB. Círculos preenchidos são valores de animais que receberam tratamento veículo, enquanto círculos vazios representam o tratamento com CORT e quadrados vazios, MET.

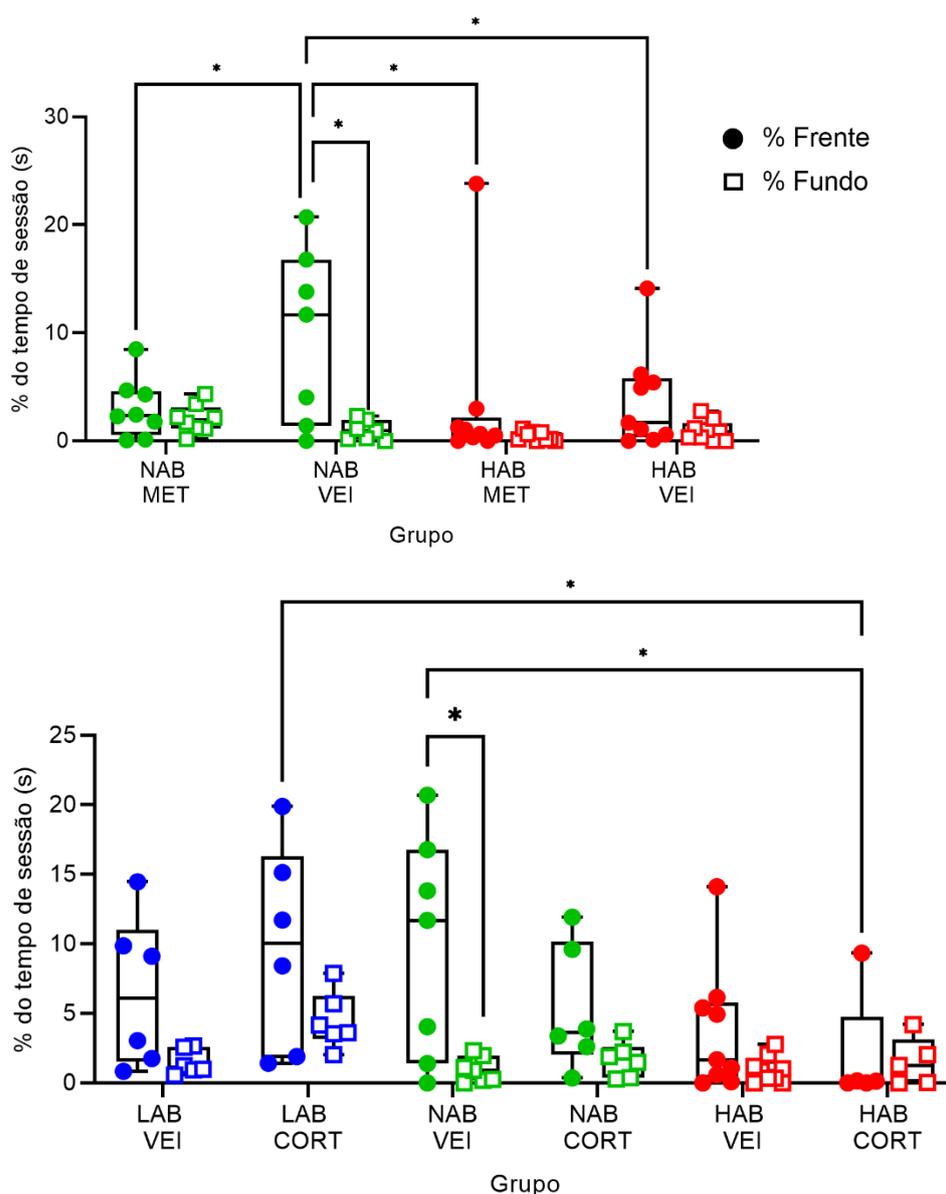
A preferência entre frente e fundo apresentou diferenças. Análises foram feitas entre CORT e VEI, e VEI e NAB, uma vez que não foi possível fazer um modelo completo, já que não houve animais LAB MET.

Para a comparação entre grupos MET, foi feita uma ANOVA de medidas repetidas e dois fatores (Local e Grupo), que indicou significância para o fator Local ( $F(1)=13,82$ ,  $p=0,001$ ). Comparações entre o responder em cada área (frente ou fundo) foram feitas pelo método de comparações múltiplas com correção Holm-Šídák, que revelou que NAB MET e NAB VEI diferiram significativamente quanto ao cavar na porção frontal da caixa ( $p=0,024$ ), assim como NAB VEI e HAB MET ( $p=0,0264$ ) e NAB VEI e HAB VEI ( $p=0,0338$ ) (Figura 40A).

Para a comparação entre grupos CORT, a mesma análise indicou significância para o Local ( $F(1)=24,17$ ,  $p<0,001$ ), enquanto o pos-hoc com correção de Holm-Šídák encontrou diferenças entre o cavar na porção da frente de C1 entre LAB CORT e HAB CORT ( $p=0,047$ ) e entre NAB VEI e HAB CORT ( $p=0,0358$ ) (Figura 3.14 B). Não foram encontradas outras diferenças entre grupos. Em comparação intra grupo, NAB VEI apresentou uma diferença significativa entre o tempo passado cavando na frente e fundo ( $p=0,002$ ).

**Figura 40**

*Cavar – Frente e Fundo*

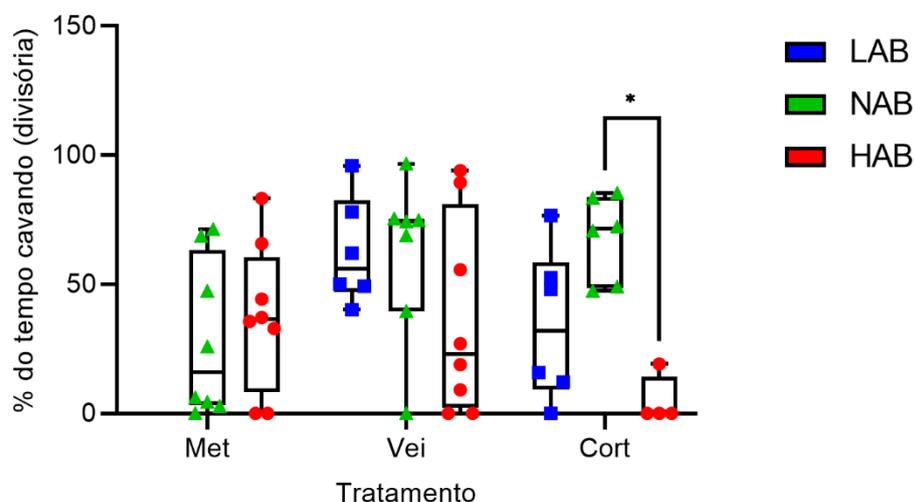


Notas: Tempo de sessão (%) passado cavando cada área (frente ou fundo) da caixa experimental. O gráfico superior (A) apresenta a comparação entre ratos VEI e MET, enquanto o gráfico inferior apresenta comparação entre animais VEI e CORT.

A eficácia do cavar (ou seja, a preferência pelo cavar junto à divisória) foi afetada diferencialmente pelo tratamento para cada linhagem (Figura 41). Uma ANOVA de dois fatores (Tratamento e Linhagem) indicou interação entre os fatores ( $F(2)=4,61$ ,  $p=0,017$ ), assim como efeito significativo de Linhagem ( $F(1)=7,708$ ,  $p=0,009$ ). Comparações pos-hoc com correção de Holm-Šídák entre grupos indicaram que HAB e NAB apresentaram diferenças significativas em relação ao percentual de tempo cavando na divisória após a administração de corticosterona ( $p=0,029$ ), com HAB CORT apresentando média de 4,79% ( $\pm 9,57$ ) do tempo cavando na divisória, em comparação a 68,04% ( $\pm 16,43$ ) de NAB CORT e 34,22 ( $\pm 29,42$ ) de LAB CORT. Não foi encontrada diferença nos demais tratamentos - HAB MET apresentou 37,408% ( $\pm 28,738$ ) do tempo cavando passado na divisória, HAB VEI apresentou 36,805% ( $\pm 38,344$ ), NAB por sua vez teve média de 26,346% ( $\pm 30,130$ ) para o MET e 61,379% ( $\pm 31,868$ ) para VEI.

**Figura 41**

*Cavar - Divisória*



Notas: Tempo de sessão (%) passado cavando junto à divisória (A', B' e/ou C'). São apresentados valores individuais e de grupo.

Por fim, a distribuição de cavar eficaz ao longo de A, B e C é mostrada na Figura 42. Diferenças entre VEI e CORT e entre VEI e MET foram investigadas. Uma ANOVA de dois fatores de medidas repetidas para o grupo MET indicou interação do fatores Grupo e Área ( $F(15)=1,853$ ,  $p=0,034$ ) e significância de Área ( $F(5)=4,96$ ,  $p>0,001$ ). Pos-

hoc de Tukey mostrou que NAB VEI diferiu seu responder em A' de A ( $p=0,002$ ), de B ( $p<0,001$ ), B' ( $p=0,005$ ), C ( $p>0,001$ ) e C' ( $p>0,001$ ), mas o mesmo não foi observado para NAB MET, indicando que o tratamento com MET afetou a preferência por local ao cavar para essa linhagem. HAB VEI e HAB MET não apresentaram padrão similar.

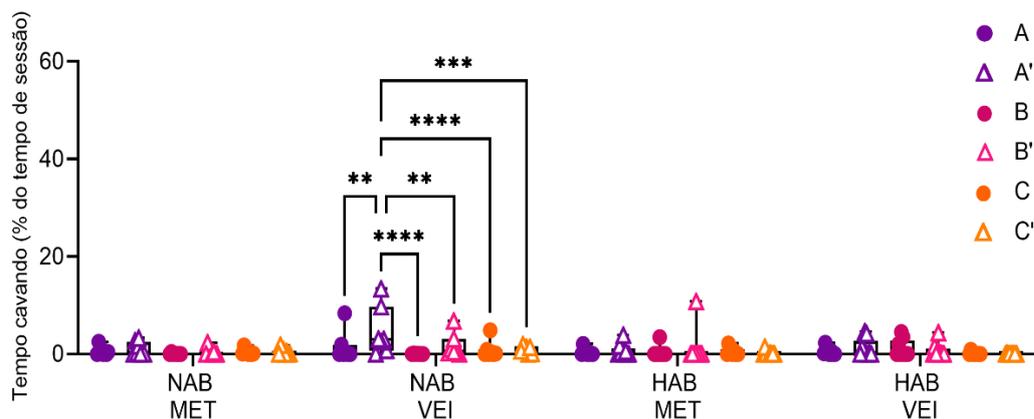
Para a comparação dos grupos CORT, a mesma análise foi efetuada, encontrando significância do fator Área ( $F(5)=14,47$ ,  $p=<0,001$ ). De acordo com as comparações múltiplas com correção de Holm-Šidák, LAB VEI apresentaram diferença no responder em A' em relação a A ( $p=0,023$ ), B ( $p=0,041$ ), C ( $p=0,02$ ) e C' ( $p=0,295$ ). Já LAB CORT não apresentou diferença entre sua preferência por área ao longo da frente de C1, indicando que o tratamento com CORT afetou esta medida.

Nos animais NAB, algo parecido foi observado: embora o responder em A' tenha sido maior que o responder em A ( $p=0,02$ ), B ( $p=0,02$ ) e C ( $p=0,018$ ), não se diferenciou do responder em B' ( $p=0,999$ ) nem C' ( $p=0,997$ ), diferentemente do observado em NAB VEI, descrito no parágrafo anterior, indicando que CORT teve um efeito similar, se mais brando, de reduzir a preferência por A' na linhagem NAB.

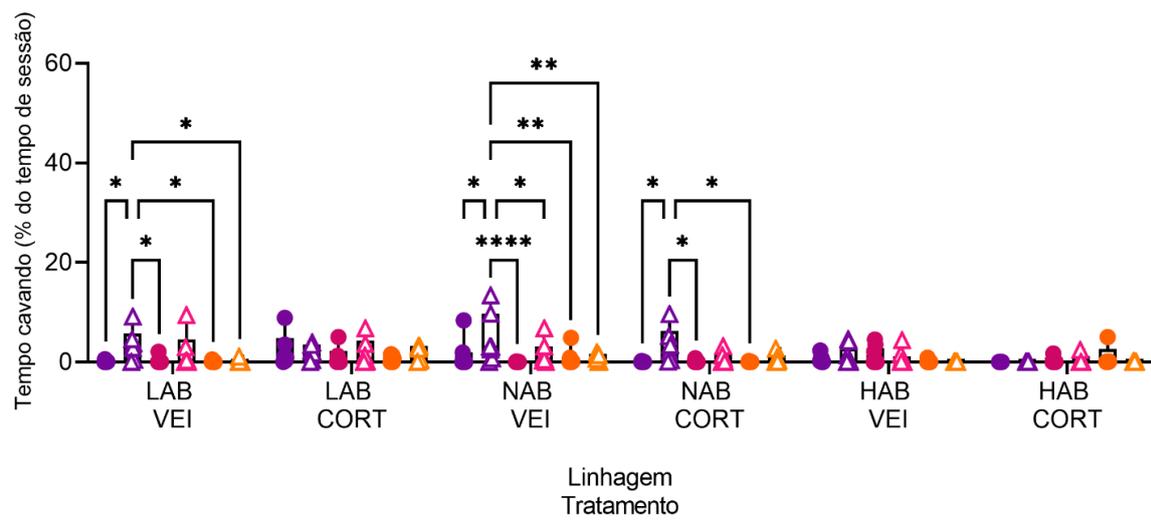
Cavar em A foi também diferente entre grupos, para LAB VEI e CORT ( $p=0,019$ ), LAB CORT e HAB MET ( $p=0,018$ ), LAB CORT e HAB CORT ( $p>0,001$ ), e HAB MET e HAB MET ( $p=0,022$ ). (Figura 42).

**Figura 42**

*Eficácia*



(figura 42, cont.)



Notas: Distribuição do cavar ao longo da porção frontal de C1, separado entre A', B', C' e A, B e C.

## DISCUSSÃO

O objetivo deste experimento foi averiguar o papel de glicocorticoides circulantes sobre a IR, assim como verificar se estes tiveram efeito similar sobre diferentes linhagens quanto o perfil comportamental em relação à ansiedade. As relações observadas não foram lineares.

Primeiramente, a caracterização das três linhagens em relação à ansiedade no campo aberto relevou que animais NAB apresentaram um perfil menos ansioso do que ratas LAB nas medidas de locomoção e tempo ereto, enquanto LAB exibiram mais tempo passado na porção central do campo. HABs, por sua vez, tiveram o desempenho mais ansioso das três linhagens em todas as medidas. A partir destes dados, fica claro que as linhagens NAB e LAB aqui apresentaram perfil similar quanto ao comportamento inato tipo ansiedade. É digno de nota que o critério utilizado no EPM para a linhagem LAB ao longo dos experimentos aqui reportados foi afrouxado, e que mesmo assim, diferente dos animais HAB, um número considerável destas foram removidas nesta etapa por não atingirem critério de linhagem (Anexo). Tomados juntas, estas evidências apontam que a qualidade, ou validade, da linhagem LAB na presente tese como um modelo de extremo de baixa ansiedade não foi ideal.

Durante o treino, HAB apresentou, em sessões específicas, desempenho aquém às outras linhagens, porém, ao final do treino, foi observado que todas as linhagens obtiveram desempenho igual, indicando a ocorrência da aprendizagem suficiente dos PRs e que, portanto, é improvável que o baixo desempenho de HAB durante o teste esteja relacionado à falta de treino.

Em relação ao desempenho no teste de IR, novamente ratas HAB resolveram o teste em uma frequência muito menor do que as demais linhagens. Ratas LAB e NAB, por sua vez, apresentaram desempenho similar quanto ao número de soluções em cada grupo de tratamento, sendo que animais VEI tiveram desempenho compatível com o observado com ratas LAB no Experimento 1. Estes dados fortalecem a hipótese de o fenótipo ansioso possuir um efeito deletério sobre o desempenho de resolução de problemas no teste de IR. Este déficit parece ir de acordo com o descrito por Byron e Khazanchi (2011), de que a demanda criativa, caracterizada no teste de IR como a emissão do comportamento de cavar até acessar C2, está em conflito com a ansiedade. Uma análise mais minuciosa da alocação do cavar durante a sessão de teste, e do efeito dos diferentes tratamentos sobre a mesma, ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos nesta diferença.

Padrões significantes emergiram na alocação do cavar ao longo de C1. Preferência forte pelo cavar na porção frontal da caixa, em A e A' especificamente, foi

observada, em especial para os grupos VEI. É significativo notar que a alocação de preferência do cavar não parece ser um efeito espúrio, uma vez que ocorreu mudança no padrão de preferência em relação ao Experimento 1, no qual a preferência do cavar se deu em B. Em ambos os casos, a preferência se deu pela área mais próxima do estímulo escada, colaborando com a hipótese de que esta passa a ter controle sobre o responder durante a situação de teste. De fato, a alocação do cavar pareceu ser função da distância da mesma, podendo ser observada uma curva similar ao que pode ser visto em um gradiente de discriminação clássico (Guttman e Kallish, 1956). Esta curva, entretanto, foi afetada pelo tratamento.

Para HAB, CORT reduziu tanto o cavar em geral, quanto a preferência por cavar na porção frontal da caixa. Efeito sobre o tempo de cavar não foi observado para NAB, porém NAB CORT diferiu de NAB VEI em relação à preferência por frente e fundo, assim como demonstrou uma eficácia reduzida no cavar. LAB CORT e LAB VEI também diferiram em relação à eficácia, sendo observado um pequeno aumento no cavar em LAB CORT acompanhado de redução significativa na eficácia. É conhecido que CORT, a depender de uma série de variáveis, pode afetar o chamado *recall* de memória, que pode ser descrito funcionalmente como a emissão de responder discriminado previamente estabelecido (Buchanan e Tranel, 2008; Sandi, 2013). Essa explicação, entretanto, se mostra improvável, uma vez que LAB CORT não apresentaram supressão do comportamento de cavar de maneira geral. A formação de novas aprendizagens, por sua vez, também pode ser afetada, de maneira positiva quanto negativa, por aumento de CORT (Lupien et al, 2002; Sandi, 2013), podendo ser encontrado um impacto sobre a capacidade de discriminação do sujeito (Besheer et al, 2012). É possível que altas concentrações de CORT tenham, então, afetado o processo aquisição de controle discriminativo sobre o comportamento de cavar que se dá durante o teste de IR.

É interessante notar que a velocidade de locomoção durante a sessão de teste não pareceu ser afetada negativamente pela corticosterona, indicando que essas alterações no cavar não são secundárias à impedimentos motores. De fato, embora este dado não tenha sido significativo, animais LAB CORT tenderam a um maior cavar; este, entretanto, não foi discriminado, ocorrendo independente da área. De acordo, não foi observada uma diferença na ocorrência de solução destes animais.

O tratamento com metirapona, por sua vez, pareceu ter um efeito de supressão do cavar, e também de redução da eficácia do mesmo. Ao contrário do esperado, não foi observado um papel facilitador da metirapona em HABs, indicando que o comprometimento observado nesta linhagem não parece ser – somente – função de uma alta concentração de corticosteroides circulantes durante a sessão de teste. Em

NABs, a metirapona teve um efeito de suprimir a ocorrência de soluções. É importante notar que os glicocorticoides têm um papel na regulação energética do organismo, e sua liberação está associada a maior disponibilidade de energia para tecidos musculares (Sapolsky et al, 2000). É possível que o bloqueio da síntese e liberação de corticosterona, promovido pelo tratamento com MET, pode ter incorrido em uma perturbação neste mecanismo energético que, por sua vez, incorreu em redução no responder. Essa hipótese, adicionalmente, é corroborada pelo leve aumento no cavar em LAB CORT, entretanto, não parece condizente com a ambulação normal exibida durante o teste pelos animais MET. É importante notar que os níveis sistêmicos de corticosterona após o tratamento com MET não foram mensurados, e portanto não pode ser determinado a eficácia do tratamento na redução de liberação de corticosterona no presente experimento, apesar da inferência de seu funcionamento a partir do comportamento observado nos sujeitos experimentais.

Os dados sobre os efeitos dos diferentes tratamentos, tomados juntos, levam a algumas conclusões principais. Em primeiro lugar, parecer haver necessidade de um certo nível circulante de corticosterona para a solução ocorrer de maneira satisfatória; a redução dos níveis de corticosterona abaixo do típico para o animal tiveram efeitos inibitórios sobre o cavar e a solução tanto na linhagem com perfil de alta ansiedade inata (HAB) quanto para animais não selecionados. De fato, a administração de CORT não afetou a ocorrência de solução, em si, porém, altas doses de CORT circulantes estiveram associadas à menor eficácia no cavar e pareceram afetar o controle discriminativo presente na tarefa. O desempenho observado em animais NAB CORT teve semelhanças ao descrito em indivíduos ansiosos por uma série de autores (Sarason, 1990; Eysenck et al, 2007; Derakshan e Eysenck, 2009), em estudos nos quais o resultado final obtido por indivíduos com maiores níveis de ansiedade foi similar ao de indivíduos não ansiosos, quanto ao número de ocorrências de solução, porém com um desempenho momento a momento diferente durante a sessão, com topografia com mais erros.

É ainda possível que, em doses mais altas de CORT, este efeito perturbador sobre o controle de estímulos seja suficiente para afetar a ocorrência de solução, assim como é observado em HAB. Em síntese, é colocada a hipótese de que a relação entre o desempenho na IR e os níveis circulante de CORT se dê na forma de uma curva em U invertido, com um ponto ótimo no qual há suficiente disponibilidade energética, porém interferência mínima no controle discriminativo. Essa hipótese é reforçada pela larga literatura descrevendo relações similares em relação à corticosterona e desempenho cognitivo (c.f. Lupien et al, 2007). Para que essa hipótese seja testada, entretanto, são

necessários estudos envolvendo diferentes doses, tanto de CORT quanto MET, de maneira a mapear melhor como se dá a interação entre estes fatores.

Uma vez que manipulações hormonais não foram capazes de aumentar o número de soluções observados em HAB, um protocolo de habituação a situação de teste foi elaborado, baseado no conceito de terapia de dessensibilização a estressores (Ross e Proctor, 1973; Finn, Sawyer e Schrodt, 2009). Isto foi feito para garantir que o desempenho de animais HAB não é determinado pela potencial aversividade da situação de teste. Adicionalmente, repetidas exposições ao teste também possibilitam a demonstração de que tempo, ou a falta dele, não foi o determinante para o baixo desempenho observado, uma vez que a duração da sessão de teste é altamente variável em outros experimentos similares (c.f.: Neves Filho, 2015) e pouco é sabido sobre o impacto da duração da sessão na solução.

## EXPERIMENTO 4

### Repetição da situação teste

#### OBJETIVO

Este experimento teve como objetivo verificar se repetidas exposições à situação de teste teria um efeito facilitador na solução para animais HAB, seja por redução do comportamento tipo ansioso relacionado à situação de teste, seja por permitir maior tempo no qual a solução pode ocorrer.

Os animais receberam uma sessão de retreino de cada PR após três exposições à situação teste, visando combater os efeitos de uma possível extinção.

#### MÉTODO

##### A. Animais

Foram usadas 5 ratas, todas de linhagem HAB, de aproximadamente 6 meses de idade.

##### B. Equipamento

Foi utilizado o mesmo equipamento descrito nos itens *EPM*, *Campo Aberto* e *Caixa Experimental* do Experimento 3.

##### C. Procedimento

O mesmo procedimento que descrito nos itens *EPM*, *OF*, *Avaliação do Ciclo Estral*, *Teste I*, *Treino* e *Teste II* do Experimento III. A situação de Teste foi repetida, com a mesma apresentação, um máximo de 6 vezes, a depender do desempenho do animal. Uma nova etapa, *Treino II* foi inserida, e será descrita adiante.

##### Treino II

As ratas que não exibiram solução do problema em nenhum teste foram submetidas a duas sessões de retreino, uma para cada comportamento. Ambas as sessões ocorreram no mesmo dia, com um intervalo de 1 h entre elas, para garantir que os animais não estivessem recentemente saciados na segunda sessão. O alimento foi retirado da gaiola viveiro durante este intervalo.

O critério para o retreino de cavar foi de obter 10 consequências enterradas em pontos aleatórios da caixa a 15 cm de profundidade. Já para o treino de escalar foi usado como critério o subir na plataforma 5 vezes e obter pelo menos 10 consequências. Não foi utilizado critério de tempo.

### Testes IV-V

Condições idênticas às anteriores. Ratas foram testadas até atingirem três soluções seguidas ou até 5 sessões de teste pós Treino I.

A ordem de apresentação de cada etapa do procedimento pode ser vista abaixo, na Figura 43.

#### **Figura 43**

##### *Desenho Experimental do Experimento II*



*Notas:* Linha do tempo do experimento. Linhas verticais significam que condições ocorreram no mesmo dia. Em dias com dois testes, ou teste e treino, cada um ocorreu em um turno – ou seja, o primeiro teste do dia foi feito pela manhã, e o segundo, pela tarde.

### **C. Análise dos dados**

Foi aplicado o mesmo método de análise descrito no Experimento 3.

Adicionalmente, um teste de correlação de Spearman foi utilizado para analisar as variáveis do campo aberto e sua relação com o desempenho no EPM.

## RESULTADOS

### EPM

Foram testadas fêmeas HAB no EPM, com critério de no máximo de 10% de proporção de tempo passado nos braços abertos. As ratas passaram em média 2,876% ( $\pm 2,41$ ) da sessão nesta área.

### Campo Aberto

O desempenho individual no campo aberto pode ser visto na Tabela 5. Foi observada uma correlação positiva e significativa entre Centro e Postura ( $r=1$ ,  $p=0,008$ ) e entre Fezes e Grooming ( $r=0,894$ ;  $p:0,05$ ). Não foi encontrada correlação entre a preferência pelo braço aberto no EPM e as variáveis mensuradas no OF.

**Tabela 5**

#### *Desempenho no OF*

Sujeito	Cruzamentos (n)	Grooming (s)	Quadrante central (s)	Levantar-se (n)	Fezes (n)
1	101	0	1,213	14	0
2	82	0	3,326	20	1
3	99	15,174	2,328	16	6
4	198	0	9,963	24	3
5	186	0,801	14,782	29	4

### Teste pré-treino

Nenhuma rata resolveu o teste em sua primeira apresentação.

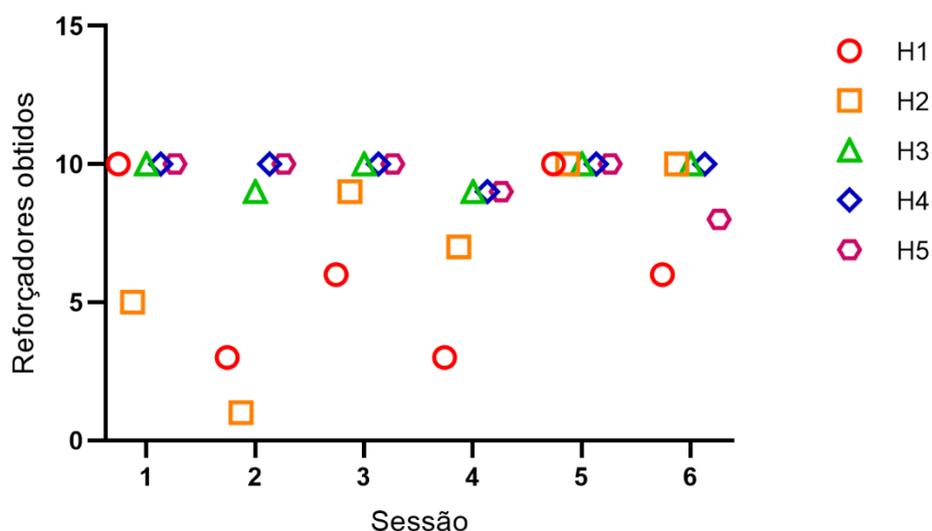
### Treino I

Nenhum animal foi removido do experimento em função de seu desempenho durante o treino.

As ratas H1 e H2 tiveram um desempenho aquém dos demais durante o treino de cavar, obtendo 38 e 36 reforçadores, respectivamente, enquanto as demais atingiram 51, 59 e 58 reforçadores (Figura 44). É importante notar que ao final do treino de cavar, entretanto, a 2 atingiu o máximo de reforçadores possíveis, indicando que o repertório foi bem aprendido.

**Figura 44**

*Reforçadores obtidos durante o treino de cavar, por animal*

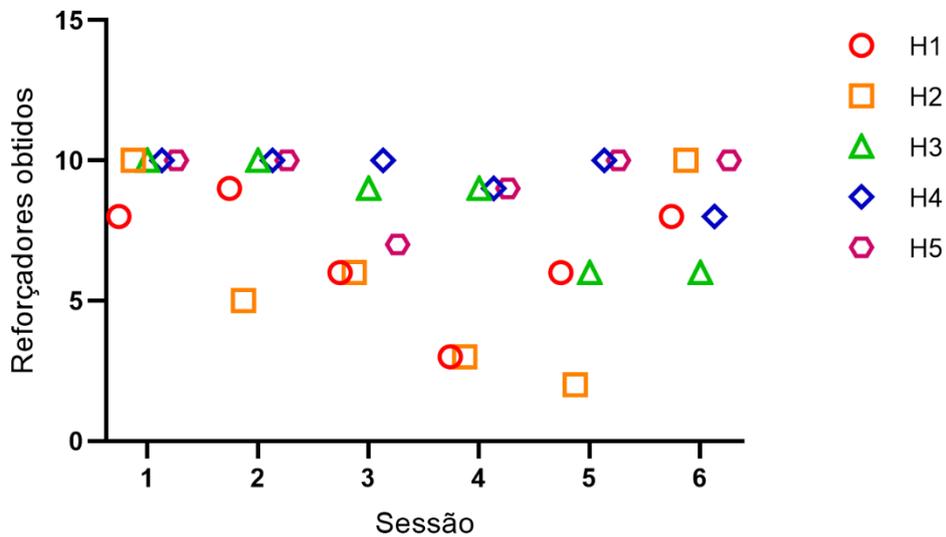


Notas: Valores do desempenho em cada sessão para cada rata, durante o treino de cavar.

Em relação ao treino de escalar, pode ser notado novamente que H1 e H2 obtiveram uma quantidade inferior (38 e 42, respectivamente) de reforçadores do que os demais animais (58, 59 e 57). Adicionalmente, H1 teve que refazer a última sessão de treino de escalar, uma vez que uma perturbação extra sessão – a entrada não prevista de um estudante na sala de teste – incorreu na ausência de respostas durante a sessão de treino. A rata H2, novamente, obteve o máximo de reforçadores durante a última sessão de treino do repertório (figura 45).

Figura 45

*Reforçadores obtidos durante o treino de escalar, por animal*



Notas: Valores individuais de reforçadores obtidos em cada sessão de escalar.

### Teste I-III

Somente o animal 5 resolveu o problema durante o Teste I (tabela 6). Já 2 apresentou sua primeira ocorrência de solução durante o Teste III. Ambos os sujeitos apresentaram a topografia de eventualmente cavar em frente à divisória, cruzar de C1 para C2, inspecionar C2 e subir a escada para acessar a plataforma contendo alimento. Em ambos os casos, a latência para a solução diminuiu em exposições sucessivas ao teste, com 5 tendo apresentado latência de 13:36 min no primeiro teste, 5:10 no segundo e 4:30 no terceiro.

**Tabela 6***Desempenho dos animais no Experimento 4*

<b>Sujeito</b>	<b>Reforçadores Totais Obtidos em Treino</b>	<b>Solução?</b>	<b>Teste da primeira solução</b>
H1	76	Não	-
H2	78 (+ 10)	Sim	III
H3	109 (+10)	Não	-
H4	118 (+ 10)	Não	-
H5	115	Sim	I

Notas: Reforçadores totais que cada rata obteve durante o treino. Valor entre parênteses representam consequências obtidas durante o re-treino.

*Treino II*

As ratas H1, H3 e H4 receberam retreino após a terceira sessão de teste, em função de não terem atingido a solução durante os testes anteriores. Todas atingiram critério, obtendo 10 reforços por repertório.

*Testes IV e V***Solução**

Os animais que passaram pelo Treino II não resolveram o Teste (Figura 46). Já o animal H2 resolveu o teste também nas apresentações seguintes, com 2:05 min de latência na segunda resolução e 3:38 min na terceira.

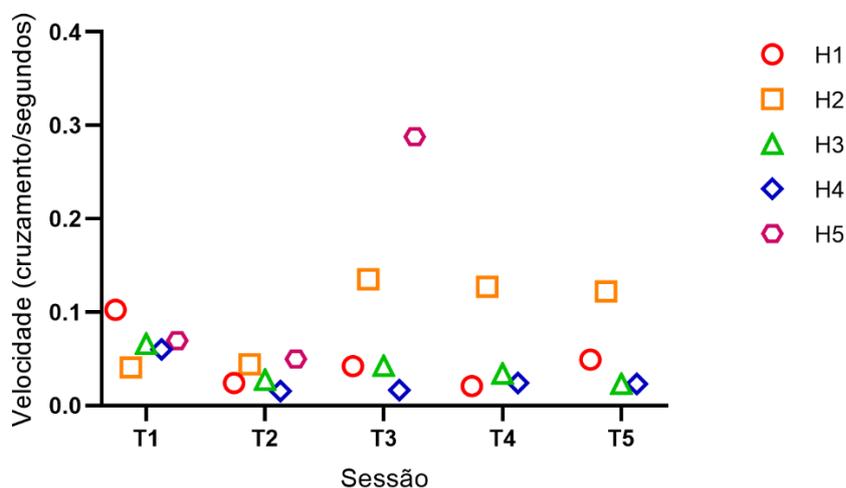
**Figura 46***Desempenho nos Testes*

Rata	Teste pré-treino	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5
H1						
H2						
H3						
H4						
H5						

Notas: Cada célula colorida representa o desempenho de um sujeito no teste. Verde significa que o animal cruzou de C1 para C2 e subiu a escada sem retornar para C1, e Cinza significa que o animal não cruzou de C1 para C2. As linhas grossas verticais entre o Teste IV e o Teste V indicam o momento de ocorrência do retreino.

### Comportamento durante o teste

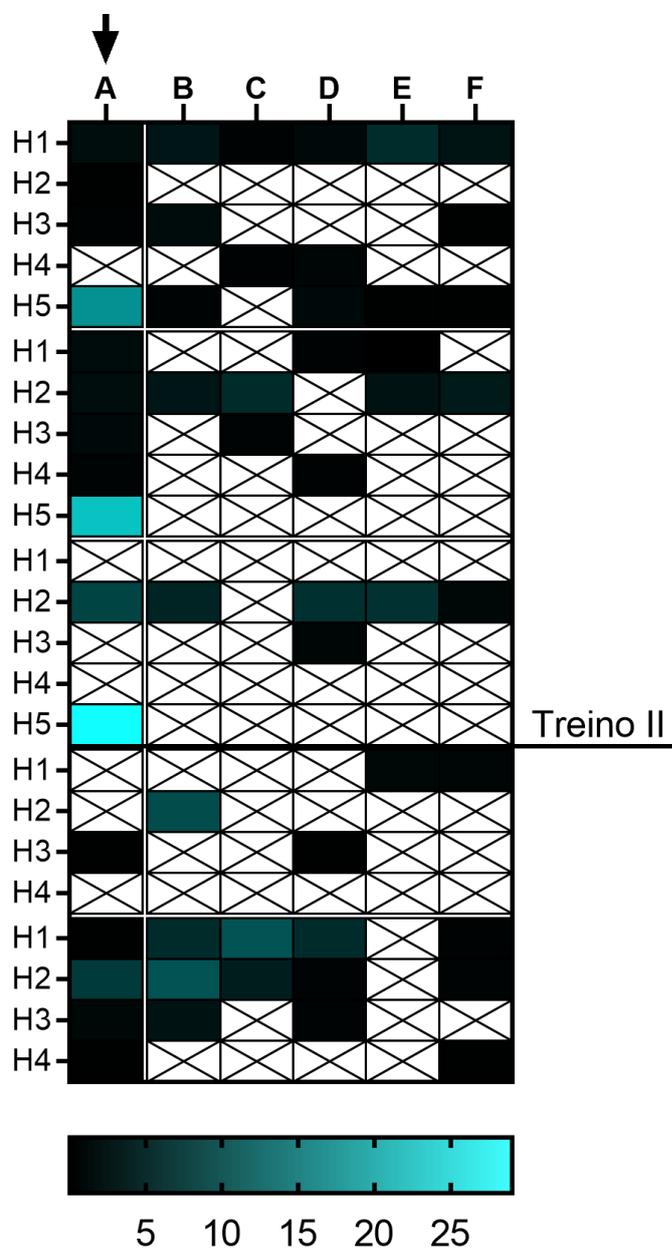
A velocidade média de cada animal durante as sessões de teste foi calculada a partir do número de cruzamentos entre áreas durante o teste (figura 47). Só foi encontrada uma relação positiva clara entre a velocidade e a ocorrência de solução em um caso (H5 em T3).

**Figura 47***Ambulação durante as sessões de teste*

O local no qual os animais apresentaram comportamento de cavar foi contabilizado, assim como a duração do cavar em cada área. Esses valores foram convertidos em porcentagem do tempo total de sessão e são apresentados a seguir de acordo com a sessão de teste (Figura 48). A rata H5 apresentou preferência marcada pelo quadrante A – aquele mais próximo da escada presente em C2. Esta preferência se tornou mais marcada com a re-exposição (e subsequente nova solução) da situação de teste. O animal H2 apresentou preferência por B, principalmente e, em segundo lugar, A. Os demais animais não apresentaram preferência visível.

**Figura 48**

*Mapa de cores do comportamento de cavar.*

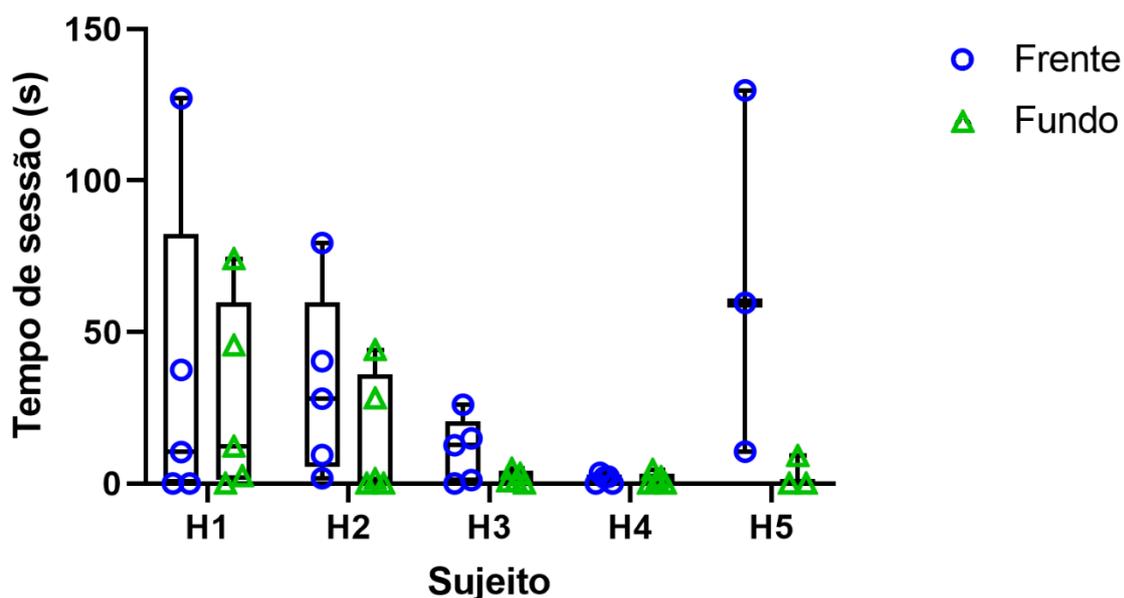


*Nota:* A linha branca vertical separa a área A (de frente á escada presente em C2) das demais áreas. Linhas brancas horizontais separam Testes. Cada linha indica a distribuição do cavar do animal ao longo das áreas da caixa, indicadas pelas diferentes colunas. Cores mais escuras indicam menor tempo de sessão passado cavando, enquanto mais azuis significam o contrário. Células com [X] indicam que não houve cavar.

A proporção entre o tempo passado cavando na porção frontal (A, B, C) e traseira (D, E, F) não foi constante para todas as ratas. De fato, pode ser observado (Figura 49) que embora tenha se apresentado uma tendência ao maior responder na frente, está não foi considerada significativa quando analisada por uma ANOVA de dois fatores (Teste e Área) e medidas repetidas. Uma das ratas, H4, não exibiu praticamente nenhum episódio de cavar, mesmo após o re-treino. É interessante notar que H4 é a rata deste experimento que apresentou o melhor desempenho durante o treino.

**Figura 49**

*Tempo de sessão (%) passado cavando na frente ou fundo de C1*



*Nota:* Tempo de sessão passado cavando na porção frontal e traseira da caixa experimental.

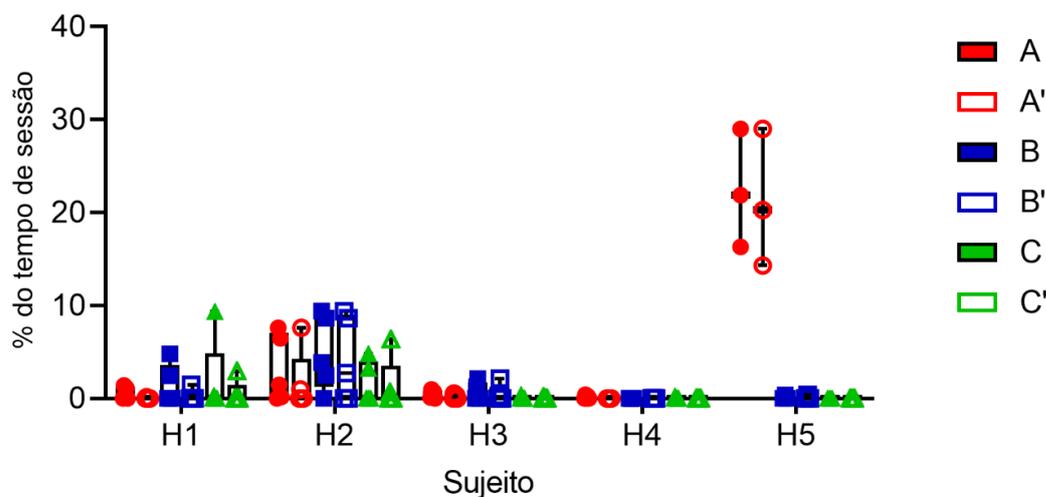
A distribuição de respostas do cavar entre A, B e C foi levantada, assim como o cavar em cada uma destas áreas e próximo à divisória, para cada indivíduo, em cada sessão (figura 50). Sessões nas quais o animal não emitiu resposta de cavar (T3 para rata 1, T3 e T4 para a rata 4) receberam o valor de 0 segundos cavando. Somente H5

apresentou padrão de preferência similar ao observado com animais não ansiosos em experimentos anteriores.

Em média, os animais passaram 9,054% ( $\pm 25,271$ ) da sessão cavando em A e 3,189% ( $\pm 7,637$ ) em A', 3,237% ( $\pm 6,256$ ) em B e 1,090% ( $\pm 2,609$ ) em B', e 2,075% ( $\pm 6,085$ ) em C e 0,444% ( $\pm 1,438$ ) em C'.

### Figura 50

*Tempo passado (em % de sessão) cavando em A, B e C, para cada rata*

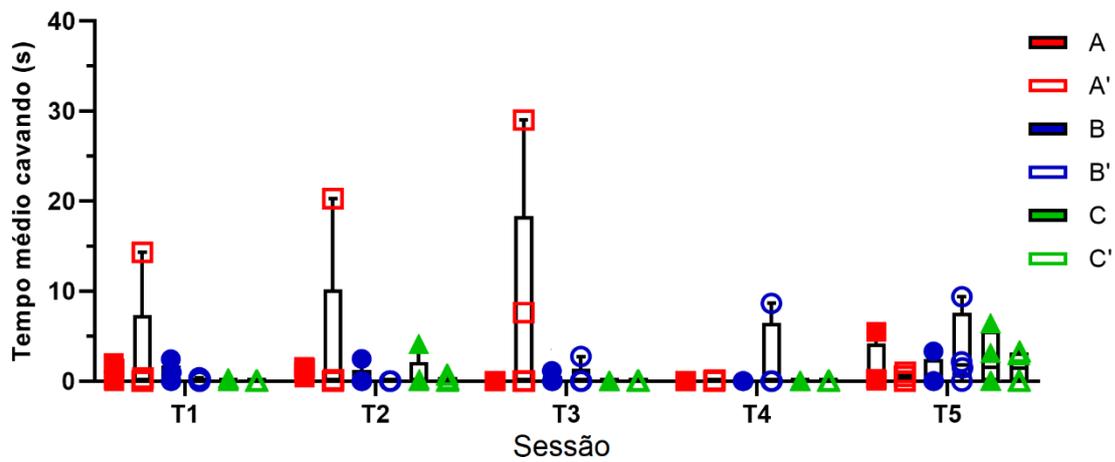


*Nota:* Valores individuais de tempo de sessão (%) passados cavando cada área em cada sessão de teste.

Por último, a duração total do cavar em cada área frontal de C1 foi organizada por tentativa de teste (Figura 51). Dessa maneira, pode ser observado que por exceção de uma tendência encabeçada por H5, não pode ser observado efeito da exposição repetida à situação de teste no cavar eficaz. É interessante notar que em T4, a sessão logo após o re-treino, não pôde ser observada nenhuma mudança consistente no responder, enquanto em T5, existem indícios de aumento do cavar em todas as áreas medidas.

Figura 51

Tempo passado cavando em cada área da parte frontal de C1, por teste



Notas: Tempo passado cavando em A, A', B, B', C e C' para cada rata em cada sessão de teste.

## DISCUSSÃO

O Experimento 4 teve como objetivo verificar se a reexposição à situação de teste, assim como o re-treino, teriam um efeito facilitador na ocorrência de solução para os animais da linhagem HAB. Esse efeito não foi observado.

Todas as ratas tiveram desempenho considerado suficiente durante o treino. Pode ser observada certa variação individual quanto ao total de reforçadores obtidos, porém não houve correlação com o desempenho mais alto e ocorrência de solução, já que as duas ratas que resolveram o problema estavam em pontas opostas quanto ao desempenho no treino. Isto vai de acordo com o observado em experimentos anteriores de que, embora a ocorrência de resolução seja função do treino das PR, a falta de ocorrência de solução nas ratas HAB não parece ser decorrente de uma não aprendizagem das PR. Também está de acordo com alguns dados da literatura de resolução por problemas que indicam que competência nos PR não é sempre o único fator determinante da ocorrência ou não de IR (Taylor et al., 2010, Neves Filho, Knaus e Taylor, 2019).

Uma rata resolveu o teste em sua primeira exposição. Esta apresentou ambos desempenho praticamente ótimo durante o treino (ficando a cinco consequências do máximo possível de ser obtido ao longo dos treinos) e menor scores de ansiedade no OF. Porém, as demais ratas com desempenho similar, não resolveram a tarefa – de fato, a rata com o melhor desempenho de todas no treino não solucionou a situação de teste, e exibiu tempos extremamente baixos de cavar durante o teste. Deve ser notado, entretanto, que alguns scores do OF – como o de tempo passado na porção central – apresentaram variação considerável. Desta maneira, não foi possível, aqui, estabelecer uma relação da intensidade do perfil ansioso das ratas HAB e o desempenho no teste de IR. Futuras pesquisas fazendo uso de mais animais HAB, com uma caracterização mais detalhada do seu perfil de comportamento tipo ansioso, podem esclarecer se existem diferentes perfis dentro do extremo de ansiedade inata quanto ao desempenho em tarefas de IR.

Em geral, a reexposição não pareceu ter efeito facilitador da emissão da solução. A taxa de cavar das ratas que não resolveram o teste em T1 não apresentou aumento ao longo das sessões de teste, pelo contrário, se mostrando bem reduzida durante a terceira sessão de teste, sugerindo que o comportamento de cavar foi posto em extinção durante as repetidas exposições à condição de teste. O mesmo foi observado para a ambulação durante o teste. De fato, esses animais frequentemente dormiram durante as sessões de teste de T2 em diante.

A inspeção visual dos gráficos parece indicar uma preferência pelo cavar na porção frontal de C1 para animais que não resolveram o teste, assim como por A e B, porém esta relação não foi significativa, não surpreendentemente, uma vez que pouca emissão de cavar foi registrada; para dezoito tentativas na quais não houve ocorrência de solução, 14 apresentaram um tempo total de cavar inferior a 15s. Para as duas ratas que resolveram o problema, entretanto, foi observado preferência marcada por A e B, em especial para H5, que apresentou a solução logo na primeira apresentação do problema.

Tomados juntas, as evidências apontam que o controle discriminativo sobre o comportamento de cavar durante a sessão de teste pode ser o mecanismo afetado em animais HAB, uma vez que não há um impedimento locomotor nem uma falta da aquisição do comportamento de cavar ou de escalar. De fato, o animal que exibiu maior preferência pelo cavar em A' foi o animal com o melhor desempenho no teste, indicando que este controle está diretamente relacionado à ocorrência de solução. A ausência de uma preferência por A em animais como H4, que obteve desempenho ótimo durante o treino, fortalece a ideia de que este controle não se dá só por preferência de local originada no treino, e sim potencialmente por uma relação emergente que se forma durante o teste, a partir do controle discriminativo múltiplo proposto por Epstein (1985).

## COMPARAÇÃO ENTRE EXPERIMENTOS

Uma versão resumida dos principais achados de cada experimento pode ser observada na Tabela 7, a seguir.

**Tabela 7**

*Comportamento observado em cada manipulação experimental*

Experimento	Linagem	Manipulação	% de solução	% solução recombinativa	Controle pela localização da Escada
<b>EXP 1</b>	LAB	Sem Treino	20%	0%	X
		Treino Inc.	50%	50%	X
		Completo	100%	66,6%	Sim
	HAB	Sem Treino	20%	0%	X
		Treino Inc.	0%	0%	X
		Completo	40%	20%	Parcial
<b>EXP 2</b>	LAB	Treino assimétrico	20%	20%	-
	HAB	Treino assimétrico	0%	0%	-
<b>EXP 3</b>	LAB	VEI	80%	50%	Sim
		CORT	80%	80%	Sim
	NAB	MET	20%	25%	Parcial
		VEI	85,7%	71,42%	Sim
	HAB	CORT	83,3%	83,3%	Sim
		MET	11,11%	11,11%	Parcial
		VEI	33,3%	22,2%	Parcial
		CORT	0%	0%	Sim
<b>EXP 4</b>	HAB	Repetição	20%-40%	Parcial	

## DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO

O fenótipo de predisposição inata de um indivíduo para a ansiedade se demonstrou um fator de peso em relação ao desempenho de ratas no teste de Cavar e Escalar adaptado, modelo o qual teve sua sensibilidade e validade demonstrado no presente trabalho.

Animais com fenótipo mais ansioso tiveram desempenho pior - menos soluções, com menor emissão da resposta de cavar e menores índices de eficácia - do que animais com fenótipo normal ou de baixa ansiedade. Já animais de comportamento tipo ansiedade baixo apresentaram desempenho compatível com o de animais não selecionados para a ansiedade.

Manipulações comportamentais como um treino mais cuidadoso ou reexposição à situação de teste não foram capazes de aproximar o comportamento de solução nos animais HAB daquele observado nos demais, indicando que esta diferença não foi puramente um artefato metodológico oriundo de treino ou tempo de sessão insuficientes.

No presente trabalho, conseguimos pela primeira vez evidências de como se dá o controle de estímulos, ponto-a-ponto, durante a tarefa de IR de cavar e escalar, demonstrado por uma série de medidas de preferência e eficácia do cavar. Estas medidas permitiram identificar o padrão típico de solução nesta tarefa, e apontar em que aspectos o comportamento de animais que não resolveram a situação problema do teste diferiram daqueles que apresentaram comportamento de resolução.

Através de todos os experimentos, ratas HAB apresentaram menor controle pela posição do estímulo 'Escada' em C2 do que os animais de outras linhagens, que tiveram o comportamento de cavar orientado a este estímulo, com preferência maior pelo cavar na frente da caixa do que no fundo, pelo cavar em proximidade à divisória e pelo cavar nas áreas em C1 imediatamente adjacentes à escada. Tomadas juntas, as evidências indicam o comportamento de ratas HAB durante o teste não esteve sobre o mesmo controle de estímulos do que as demais. A ausência de transferência de controle discriminativo – a generalização funcional de Epstein (1985) – durante a situação de teste seria, então, um dos fatores determinantes para a ausência de soluções nestes animais. Um déficit nesse processo comportamental estaria de acordo com o descrito na literatura sobre indivíduos que sofrem de TAs ou possuem alto traço de ansiedade e a dificuldade em adaptar o comportamento a novas contingências

((Park e Moghaddam, 2017), assim como algumas medidas de inflexibilidade observadas (Wilson et al., 2018). Em contrapartida, após as modificações feitas ao procedimento após o experimento 1, não foi observada evidência de interferência de respostas de freezing ou que poderiam ser identificadas como respostas de ansiedade relativas à condição de teste, e que desta maneira poderiam estar em concorrência ao comportamento de resolver o teste. De fato, na ocorrência de reexposição dos animais HAB à situação de teste, diversas vezes as ratas foram observadas dormindo. Adicionalmente, também não foi observada em animais HAB algo que seria funcionalmente similar à persistência em antigas estratégias descrita na literatura (Park e Moghaddam, 2017; Wilson et al., 2018), que seria a insistência no cavar indiscriminado. Algo similar foi observado a partir da administração de corticosterona, quando a eficácia do cavar foi reduzida; a comparação, entretanto, não é completa, uma vez que CORT não afetou a probabilidade da ocorrência de solução.

Manipulações dos níveis de corticosteroides circulantes demonstraram que estes hormônios têm um papel durante a IR, enquanto o fenótipo (alta ou baixa ansiedade de traço) parece determinar a sensibilidade à CORT. Um intervalo ótimo de concentração de corticosterona circulante durante a IR é sugerida pelos dados, com efeitos negativos observados em valores muito baixos ou altos; a posição desta curva em U invertido, entretanto, apresentaria variação de acordo com a sensibilidade individual, sendo que uma maior tendência à ansiedade algo que empurraria a mesma para a esquerda.

Limitações do presente estudo devem ser apontadas. Em primeiro lugar, o estudo foi desenvolvido somente com fêmeas, sendo assim que este fenômeno pode ter um diferente formato em machos; entretanto, dada maior prevalência de TAs em indivíduos do sexo feminino do que do masculino (APA, 2014; 2014), o perfil nesta população se mostra especialmente relevante (Bekker e van Mens-Verhulst, 2007)

Adicionalmente, o controle do estro durante a situação de teste apresentou uma série de problemas. Diversas amostras não puderam ser analisadas em função da pandemia de COVID-19, uma vez que o acesso à universidade e equipamento de microscopia estava impossibilitado. Desta maneira, esse aspecto do perfil hormonal das ratas durante as sessões de teste não pode ser averiguado; uma vez que existem interações importantes entre as flutuações hormonais relativas ao ciclo estral e a sensibilidade de fêmeas a estressores (Bangasser et al, 2018) e ansiedade (Bekker e van Mens-Verhulst, 2007), é possível que um nível de variabilidade não explicado dos dados seja oriundo dessa variável.

Dosagem dos valores séricos de corticosterona antes, durante, e logo após o teste também seria de interesse, embora dificuldades práticas tornem essa mensuração complicada, em virtude da impossibilidade do uso de cateter jugular durante o cavar e escalar. Definição da curva de CORT durante a situação de teste, assim como correlação entre valores individuais e ocorrência de solução, trariam maior detalhamento sobre a interação da CORT com a ocorrência de IR e também com a transferência de controle discriminativo durante a situação de teste.

Apesar das limitações, entretanto, o presente estudo trouxe inovações importantes para a área: o desenvolvimento e validação de uma nova caixa de teste que permite uma observação mais detalhada do comportamento e que necessita de treino curto e padronizado; desenvolvimento e aplicação de um método de análise do comportamento de cavar durante a situação de teste que permitiu identificar e começar a caracterizar o controle de estímulos e processos relacionados durante um teste de IR e, por último, a identificação e descrição do desempenho de animais HAB, NAB e LAB na IR, junto com um processo potencialmente envolvido nas diferenças observadas entre linhagens.

## REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association, Jested, P. D. V., Lieberman, P.-E. J. A., Fassler, T. D., Peele, S. R., Akaka, J., Bernstein, C. A., Crowley, B., Everett, A. S., Geller, J., Graff, M. D., Greene, J. A., Kashtan, J. F., Mcvoy, M. K., Nininger, J. E., Oldham, J. M., Schatzberg, A. F., Widge, A. S., & Vanderlip, E. R. (2014). *MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS*.
- Alexander, J. K., Hillier, A., Smith, R. M., Tivarus, M. E., & Beversdorf, D. Q. (2007). Beta-adrenergic Modulation of Cognitive Flexibility during Stress. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 19(3), 468–478. <https://doi.org/10.1162/jocn.2007.19.3.468>
- Andreatini, R., C. Blanchard, R. Blanchard, M.L. Brandão, A.P. Carobrez, G. Griebel, F.S. Guimarães, et al. "The Brain Decade in Debate: II. Panic or Anxiety? From Animal Models to a Neurobiological Basis". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34, nº 2 (fevereiro de 2001): 145–54. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2001000200001>.
- Angelidis, A., Solis, E., Lautenbach, F., Does, W. van der, & Putman, P. (2019). I'm going to fail! Acute cognitive performance anxiety increases threat-interference and impairs WM performance. *PLOS ONE*, 14(2), e0210824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210824>
- Bahrami, F., & Yousefi, N. (2011). *Females Are More Anxious Than Males: A Metacognitive Perspective*. 5(2), 8.
- Bamberg, E., Palme, R., & Meingassner, J. G. (2001). Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Laboratory Animals*, 35(4), 307–314. <https://doi.org/10.1258/0023677011911886>
- Bangasser, D. A., & Valentino, R. J. (2014). Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 303–319. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.008>
- Bar Or, M., & Klavir, O. (2021). The Differential Effects of the Amount of Training on Sensitivity of Distinct Actions to Reward Devaluation. *Brain Sciences*, 11(6), 732. <https://doi.org/10/gmg9dk>
- Bateson, M., Brilot, B., & Nettle, D. (2011). Anxiety: An Evolutionary Approach. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 56(12), 707–715. <https://doi.org/10.1177/070674371105601202>

- Besheer, J., Fisher, K. R., Grondin, J. J. M., Cannady, R., & Hodge, C. W. (2012). The effects of repeated corticosterone exposure on the interoceptive effects of alcohol in rats. *Psychopharmacology*, 220(4), 809–822. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2533-8>
- Bondi, C. O., Rodriguez, G., Gould, G. G., Frazer, A., & Morilak, D. A. (2008). Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(2), 320–331. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301410>
- Bosch, O. J., Krömer, S. A., & Neumann, I. D. (2006). Prenatal stress: Opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *The European Journal of Neuroscience*, 23(2), 541–551. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04576.x>
- Buckingham, J. C., Döhler, K.-D., & Wilson, C. A. (1978). ACTIVITY OF THE PITUITARY-ADRENOCORTICAL SYSTEM AND THYROID GLAND DURING THE OESTROUS CYCLE OF THE RAT. *Journal of Endocrinology*, 78(3), 359–366. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0780359>
- Byron, K., & Khazanchi, S. (2011). A Meta-Analytic Investigation of the Relationship of State and Trait Anxiety to Performance on Figural and Verbal Creative Tasks. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 37(2), 269–283. <https://doi.org/10.1177/0146167210392788>
- Campos, A. C., Fogaca, M. V., Aguiar, D. C., & Guimaraes, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(suppl 2), S101–S111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Carvalho, S. da R. (2007). A CARGA ALOSTÁTICA: UMA REVISÃO.
- Crocq, M.-A. (2015). A history of anxiety: From Hippocrates to. *Clinical Research*, 17(3), 7.
- D'Souza, Deepthi, e Monika Sadananda. “Estrous Cycle Phase-Dependent Changes in Anxiety- and Depression-Like Profiles in the Late Adolescent Wistar-Kyoto Rat”. *Annals of Neurosciences* 24, nº 3 (julho de 2017): 136–45. <https://doi.org/10.1159/000477151>.
- Davis, G. A. (1966). Current status of research and theory in human problem solving. *Psychological Bulletin*, 66(1), 36–54. <https://doi.org/10.1037/h0023460>
- Davis, G. A. (1973). *Psychology of Problem Solving: Theory and Practice* (1st edição). Basic Books, Inc.
- de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, 22(10), 422–426. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01438-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01438-1)

- Degroot, A., Wade, M., Salhoff, C., Davis, R. J., Tzavara, E. T., & Nomikos, G. G. (2004). Exposure to an elevated platform increases plasma corticosterone and hippocampal acetylcholine in the rat: Reversal by chlordiazepoxide. *European Journal of Pharmacology*, 493(1–3), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.014>
- Delage, P. (2006). *Investigações sobre o papel da generalização funcional em uma situação de resolução súbita de problemas (“insight”) em Rattus Norvegicus* [PhD Thesis]. Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Pará, Belém, PA.
- Derakshan, N., & Eysenck, M. W. (2009). Anxiety, processing efficiency, and cognitive performance: New developments from attentional control theory. *European Psychologist*, 14(2), 168–176. <https://doi.org/10.1027/1016-9040.14.2.168>
- Dicezare, R. H. F. (2017). *Recombinação de comportamento em ratos Wistar (Rattus norvegicus) em um novo procedimento de deslocamento de caixa* [Text, Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.47.2017.tde-24072017-175858>
- Donner, N. C., & Lowry, C. A. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 465(5), 601–626. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>
- Duncker, K. (1945). On problem-solving. *Psychological Monographs*, 58(5), i–113. <https://doi.org/10.1037/h0093599>
- Epstein, R., Kirshnit, C., Lanza, R. et al. ‘Insight’ in the pigeon: antecedents and determinants of an intelligent performance. *Nature* **308**, 61–62 (1984). <https://doi.org/10.1038/308061a0>
- Epstein, R. (1985). The Spontaneous Interconnection of Three Repertoires. *The Psychological Record*, 35(2), 131–141. <https://doi.org/10.1007/bf03394917>
- Eysenck, M. W., Derakshan, N., Santos, R., & Calvo, M. G. (2007). Anxiety and cognitive performance: Attentional control theory. *Emotion*, 7(2), 336–353. <https://doi.org/10.1037/1528-3542.7.2.336>
- Faravelli, C., Sauro, C. L., Godini, L., Lelli, L., Benni, L., Pietrini, F., Lazzarotti, L., Talamba, G. A., Fioravanti, G., & Ricca, V. (2012) *Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders*. 2(1), 13.
- Figueiredo, Helmer F., Yvonne M. Ulrich-Lai, Dennis C. Choi, e James P. Herman. “Estrogen potentiates adrenocortical responses to stress in female rats”. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292, nº 4 (1º de abril de 2007): E1173–82. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2006>.
- Finn, Amber N., Chris R. Sawyer, e Paul Schrod. “Examining the Effect of Exposure Therapy on Public Speaking State Anxiety”. *Communication Education* 58, nº 1 (1º de janeiro de 2009): 92–109. <https://doi.org/10.1016/j.comedu.2008.12.005>.

- Goldman, Jerome M., Ashley S. Murr, e Ralph L. Cooper. "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies". *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 80, n° 2 (abril de 2007): 84–97. <https://doi.org/10/cw6pd7>.
- Graeff, F. G. (2007). Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 29(suppl 1), s3–s6. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462007000500002>
- Graeff, F. G. & Zangrossi Junior, H. (2010). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. *Psychology & Neuroscience*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2010.1.002>
- Greenberg, P. E., Sisitsky, T., Kessler, R. C., Finkelstein, S. N., Berndt, E. R., Davidson, J. R. T., & Fyer, A. J. (1999). The Economic Burden of Anxiety Disorders in the 1990s. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 60(7), 0–0. <https://doi.org/10.4088/JCP.v60n0702>
- Grillon, C., Robinson, O. J., O'Connell, K., Davis, A., Alvarez, G., Pine, D. S., & Ernst, M. (2017). Clinical anxiety promotes excessive response inhibition. *Psychological Medicine*, 47(3), 484–494. <https://doi.org/10.1017/s0033291716002555>
- Guttman, Norman, e Harry I. Kalish. "Discriminability and stimulus generalization". *Journal of Experimental Psychology* 51, n° 1 (1956): 79–88. <https://doi.org/10/fr2wvt>.
- Hallion, L. S., Tolin, D. F., Assaf, M., Goethe, J., & Diefenbach, G. J. (2017). Cognitive Control in Generalized Anxiety Disorder: Relation of Inhibition Impairments to Worry and Anxiety Severity. *Cognitive Therapy and Research*, 41(4), 610–618. <https://doi.org/10.1007/s10608-017-9832-2>
- Han, D. H., Park, H. W., Kee, B. S., Na, C., Na, D.-H. E., & Zaichkowsky, L. (2011). Performance Enhancement with Low Stress and Anxiety Modulated by Cognitive Flexibility. *Psychiatry Investigation*, 8(3), 221–226. <https://doi.org/10.4306/pi.2011.8.3.221>
- Henniger, M. S. H., Ohl, F., Hölter, S. M., Weißenbacher, P., Toschi, N., Lörscher, P., Wigger, A., Spanagel, R., & Landgraf, R. (2000). Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, 111(1–2), 153–163. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00151-0)
- Jacobson-Pick, S., & Richter-Levin, G. (2010). Differential impact of juvenile stress and corticosterone in juvenility and in adulthood, in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.036>

- Jaric, I., Rocks, D., Cham, H., Herchek, A., & Kundakovic, M. (2019). Sex and Estrous Cycle Effects on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in a Two-Hit Developmental Stress Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00074>
- Kallen, V. L., Tulen, J. H. M., Utens, E. M. W. J., Treffers, P. D. A., Jong, F. H. D., & Ferdinand, R. F. (2008). Associations between HPA axis functioning and level of anxiety in children and adolescents with an anxiety disorder. *Depression and Anxiety*, 25(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/da.20287>
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Landgraf, R., & Wigger, A. ([s.d.]). *High vs Low Anxiety-Related Behavior Rats: An Animal Model of Extremes in Trait Anxiety*. 14.
- Lamprea, M. R., F. P. Cardenas, J. Setem, e S. Morato. “Thigmotactic Responses in an Open-Field”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41 (fevereiro de 2008): 135–40. <https://doi.org/10/fbfz8q>.
- Lee, W. E., M. E. J. Wadsworth, e M. Hotopf. “The Protective Role of Trait Anxiety: A Longitudinal Cohort Study”. *Psychological Medicine* 36, nº 3 (março de 2006): 345–51. <https://doi.org/10/c36knc>.
- Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., & Landgraf, R. (1998). Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behavioural Brain Research*, 94(2), 301–310. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00198-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00198-8)
- Lovick, T. A. (2012). Estrous cycle and stress: Influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4), 314–320. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500044>
- Lukasik, Karolina M., Otto Waris, Anna Soveri, Minna Lehtonen, e Matti Laine. “The Relationship of Anxiety and Stress With Working Memory Performance in a Large Non-Depressed Sample”. *Frontiers in Psychology* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00004>.
- Luca, L., & Nemeroff, C. B. ([s.d.]). The Role of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis in Anxiety Disorders. In *Anxiety Disorders*. Oxford University Press. Recuperado 9 de abril de 2021, de <https://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199395125.001.0001/med-9780199395125-chapter-28>

- Lukasik, K. M., Waris, O., Soveri, A., Lehtonen, M., & Laine, M. (2019). The Relationship of Anxiety and Stress With Working Memory Performance in a Large Non-depressed Sample. *Frontiers in Psychology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00004>
- Lupien, S. J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., & Schramek, T. E. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition*, 65(3), 209–237.  
<https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.02.007>
- Marasco, V., Boner, W., Heidinger, B., Griffiths, K., & Monaghan, P. (2015). Repeated exposure to stressful conditions can have beneficial effects on survival. *Experimental Gerontology*, 69, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.06.011>
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinics of North America*, 32(3), 549–575.  
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, e A. P. Tanno. “Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations”. *Brazilian Journal of Biology* 62, n° 4a (novembro de 2002): 609–14. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>.
- McEwen, B. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological reviews*, 87, 873–904.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 153(18), 2093–2101.
- McEwen, Bruce S, & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2–15. [https://doi.org/10.1016/s0018-506x\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s0018-506x(02)00024-7)
- Mora, S., Dussaubat, N., & Díaz-Véliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 21(7), 609–620. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(96)00015-7)
- Mykletun, Arnstein, Ottar Bjerkeset, Simon Overland, Martin Prince, Michael Dewey, e Robert Stewart. “Levels of Anxiety and Depression as Predictors of Mortality: The HUNT Study”. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science* 195, n° 2 (agosto de 2009): 118–25. <https://doi.org/10/cfc5m6>.
- Neves Filho, H. (2018). *Criatividade: Suas origens e produtos sob uma perspectiva comportamental*.
- Neves Filho, H. B., Knaus, Y. C., & Taylor, A. H. (2019). New Caledonian Crows Can Interconnect Behaviors Learned in Different Contexts, with Different Consequences,

- and After Exposure to Failure. *International Journal of Comparative Psychology*, 32. <https://doi.org/10.46867/ijcp.2019.32.00.11>
- Neves Filho, H. B., Stella, L. D. R., Dicezare, R. H. F., & Garcia-Mijares, M. (2015). Insight in the white rat: Spontaneous interconnection of two repertoires in *Rattus norvegicus*. *European Journal of Behavior Analysis*, 16(2), 188–201. <https://doi.org/10.1080/15021149.2015.1083283>
- Neves Filho, H., & Neto, M. (2013). Criatividade nas artes: A Recombinação de Repertórios Comportamentais como Processo Básico. *BOLETIM CONTEXTO*, 38, 133.
- Neves Filho, H., Neto, M., Taytelbaum, G., Malheiros, R., & Knaus, Y. (2016). Effects of different training histories upon manufacturing a tool to solve a problem: Insight in capuchin monkeys (*Sapajus spp.*). *Animal Cognition*, 19, 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/s10071-016-1022-1>
- Newell, K. M. (1985). Coordination, Control and Skill. In D. Goodman, R. B. Wilberg, & I. M. Franks (Orgs.), *Advances in Psychology* (Vol. 27, p. 295–317). North-Holland. [https://doi.org/10.1016/S0166-4115\(08\)62541-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4115(08)62541-8)
- Nogueira, M., & Fleith, D. de S. (2019). Qual é a Relação entre Criatividade e Transtorno Mental? *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 21(3), 317–331. <https://doi.org/10.31505/rbtcc.v21i3.1315>
- Ohl, F. “Animal Models of Anxiety”. *Handbook of Experimental Pharmacology*, nº 169 (2005): 35–69. [https://doi.org/10.1007/3-540-28082-0\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-28082-0_2).
- Östberg, Viveca, Ylva B. Almquist, Lisa Folkesson, Sara Brolin Låftman, Bitte Modin, e Petra Lindfors. “The Complexity of Stress in Mid-Adolescent Girls and Boys”. *Child Indicators Research* 8, nº 2 (1º de junho de 2015): 403–23. <https://doi.org/10/f3n7vb>.
- Owens, Matthew, Jim Stevenson, Julie A. Hadwin, e Roger Norgate. “When Does Anxiety Help or Hinder Cognitive Test Performance? The Role of Working Memory Capacity”. *British Journal of Psychology* 105, nº 1 (2014): 92–101. <https://doi.org/10.1111/bjop.12009>.
- Paccola, C C, C G Resende, T Stumpp, S M Miraglia, e I Cipriano. “The Rat Estrous Cycle Revisited: A Quantitative and Qualitative Analysis”, 2013, 8.
- Park, Junchol, e Bitá Moghaddam. “Impact of Anxiety on Prefrontal Cortex Encoding of Cognitive Flexibility”. *Neuroscience* 345 (março de 2017): 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.013>.
- Pessoa Neto, S. R., Azevêdo de Araújo, S., Prata Oliveira, M., Neves Filho, H., & Tatmatsu, D. (2019). *Modelo experimental de recombinação de repertórios em humanos em um ambiente virtual*. <https://doi.org/10.31505/rbtcc.v21i3.1348>

- Jacobson-Pick, S., & Richter-Levin, G. (2010). Differential impact of juvenile stress and corticosterone in juvenility and in adulthood, in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.036>
- Pigott, T. A. (2003). Anxiety disorders in women. *The Psychiatric Clinics of North America*, 26(3), 621–672, vi–vii. [https://doi.org/10.1016/s0193-953x\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/s0193-953x(03)00040-6)
- Raulo, Aura, e Ben Dantzer. “Associations between Glucocorticoids and Sociality across a Continuum of Vertebrate Social Behavior”. *Ecology and Evolution* 8, n° 15 (2018): 7697–7716. <https://doi.org/10/gd4z5q>.
- Ross, S. M. e Proctor, S. (1973) “Frequency and Duration of Hierarchy Item Exposure in a Systematic Desensitization Analogue”. *Behaviour Research and Therapy* 11, n° 3 (1° de agosto de 1973): 303–12. <https://doi.org/10/d65tjw>.
- Rubinow, D. R., & Schmidt, P. J. (2019). Sex differences and the neurobiology of affective disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 111–128. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0148-z>
- Salome, N., Viltart, O., Darnaudery, M., Salchner, P., Singewald, N., Landgraf, R., Sequeira, H., & Wigger, A. (2002). Reliability of high and low anxiety-related behaviour: Influence of laboratory environment and multifactorial analysis. *Behavioural Brain Research*, 11. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(02\)00135-3](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(02)00135-3)
- Sandi, C. (2013). Stress and cognition: Stress and cognition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 4(3), 245–261. <https://doi.org/10.1002/wcs.1222>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89. <https://doi.org/2019041122212550200>
- Sarason, I. G., Sarason, B. R., & Pierce, G. R. (1990). Anxiety, cognitive interference, and performance. *Journal of Social Behavior & Personality*, 5(2), 1–18.
- Shahan, T.A. (2013) “Attention and conditioned reinforcement”. In *APA handbook of behavior analysis, Vol. 1: Methods and principles*, 387–410. American Psychological Association <https://doi.org/10.1037/13937-017>.
- Shettleworth, S. J. (2010). *Cognition, evolution, and behavior* (2nd ed). Oxford University Press.
- Shettleworth, S. J. (2012) “Do Animals Have Insight, and What Is Insight Anyway?” *Canadian Journal of Experimental Psychology/Revue Canadienne de Psychologie Expérimentale* 66, n° 4. 217–26. <https://doi.org/10.1037/a0030674>.

- Silvia, P. J., & Kimbrel, N. A. (2010). A dimensional analysis of creativity and mental illness: Do anxiety and depression symptoms predict creative cognition, creative accomplishments, and creative self-concepts? *Psychology of Aesthetics, Creativity, and the Arts*, 4(1), 2–10. <https://doi.org/10.1037/a0016494>
- Skinner, B. F. (1966). *What is the experimental analysis of behavior?1*. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 9(3), 213–218. doi:10.1901/jeab.1966.9-213
- Skinner, B. F. (1984). An operant analysis of problem solving. *Behavioral and Brain Sciences*, 7(4), 583–591. <https://doi.org/10.1017/S0140525X00027412>
- Steimer, T. (2011a). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), 495–506.
- Steimer, T. (2011b). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: Some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), 495–506.
- Steutde-Schmiedgen, S., Wichmann, S., Stalder, T., Hilbert, K., Muehlhan, M., Lueken, U., & Beesdo-Baum, K. (2017). Hair cortisol concentrations and cortisol stress reactivity in generalized anxiety disorder, major depression and their comorbidity. *Journal of Psychiatric Research*, 84, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.09.024>
- Svihra, M., & Katzman, M. A. (2004). Behavioural inhibition: A predictor of anxiety. *Paediatrics & Child Health*, 9(8), 547–550.
- Tafet, G. E., & Nemeroff, C. B. (2020). Pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: The Role of the HPA Axis. *Frontiers in Psychiatry*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00443>
- Taylor, A. H., Elliffe, D., Hunt, G. R., & Gray, R. D. (2010). Complex cognition and behavioural innovation in New Caledonian crows. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1694), 2637–2643. <https://doi.org/10/bh4fph>
- ter Horst, J. P., de Kloet, E. R., Schächinger, H., & Oitzl, M. S. (2012a). Relevance of Stress and Female Sex Hormones for Emotion and Cognition. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(5), 725–735. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9774-2>
- ter Horst, J. P., de Kloet, E. R., Schächinger, H., & Oitzl, M. S. (2012b). Relevance of stress and female sex hormones for emotion and cognition. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(5), 725–735. <https://doi.org/10.1007/s10571-011-9774-2>
- Vamvakopoulos, N. C., & Chrousos, G. P. (1993). Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotropin-releasing hormone gene expression. Potential implications for the sexual dimorphism of the stress response and immune/inflammatory reaction. *Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1896–1902.
- Vreeburg, S. A., Zitman, F. G., van Pelt, J., Derijk, R. H., Verhagen, J. C. M., van Dyck, R., Hoogendijk, W. J. G., Smit, J. H., & Penninx, B. W. J. H. (2010). Salivary cortisol levels

- in persons with and without different anxiety disorders. *Psychosomatic Medicine*, 72(4), 340–347. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181d2f0c8>
- Vytal, K., Cornwell, B., Arkin, N., & Grillon, C. (2012). Describing the interplay between anxiety and cognition: From impaired performance under low cognitive load to reduced anxiety under high load. *Psychophysiology*, 49(6), 842–852. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2012.01358.x>
- Waffarn, F., & Davis, E. P. (2012). Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis of the fetus and newborn: Experimental findings and clinical considerations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 207(6), 446–454. <https://doi.org/10/f2g8z9>
- Welberg, L. A. M., Seckl, J. R., & Holmes, M. C. (2000). Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *European Journal of Neuroscience*, 12(3), 1047–1054. <https://doi.org/10/bb68pf>
- WHO. (2017). *Depression and Other Common Mental Disorders*.
- Wigger, A., Loerscher, P., Weissenbacher, P., Holsboer, F., & Landgraf, R. ([s.d.]). *Cross-Fostering and Cross-Breeding of HAB and LAB Rats: A Genetic Rat Model of Anxiety*. 12.
- Wilson, C. G., Nusbaum, A. T., Whitney, P., & Hinson, J. M. (2018). Trait anxiety impairs cognitive flexibility when overcoming a task acquired response and a preexisting bias. *PLOS ONE*, 13(9), e0204694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204694>
- Zamignani, D. R., & Banaco, R. A. (2005). Um Panorama Analítico-Comportamental sobre os Transtornos de Ansiedade. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 7(1). <https://doi.org/10.31505/rbtcc.v7i1.44>
- Yener, T., Turkkani Tunc, A., Aslan, H., Aytan, H., & Cantug Caliskan, A. (2007). Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: How reliable? *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 36(1), 75–77. <https://doi.org/10/dmffd>

## ANEXO

I - Animais removidos no teste de EPM por não atingirem critério de linhagem.

### EXMPERIMENTO 1

Foram testadas 34 ratas da linhagem LAB, 9 das quais não atingiram o critério estipulado para a linhagem (mínimo de 20 % do tempo de teste passado nos braços abertos do labirinto). Da linhagem HAB, foram testadas 27 ratas, todas as quais atingiram o critério de no máximo 10% do tempo de sessão passado nos braços abertos.

### EXPERIMENTO 2

Foram testadas 11 ratas LAB, 3 das quais não atingiram o critério de mínimo de 20% de tempo de sessão passado nos braços abertos. Dos setes sujeitos HAB testados, 1 foi excluído.

### EXPERIMENTOS 3 E 4

Ao total, vinte e dois (22) animais LAB foram testados no EPM, destes, 7 foram excluídos por não estar de acordo com o critério. Dos animais HAB, quarenta (40) foram testados, dos quais 9 não se conformaram ao critério de máximo de 15% do tempo nos braços abertos.