

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

**Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre a aprendizagem reversa
em ratos: implementação do teste e exploração de diferenças entre machos
e fêmeas**

ERINETE DA SILVA LEITE

SÃO CARLOS / SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre a aprendizagem reversa em ratos: implementação do teste e exploração de diferenças entre machos e fêmeas

ERINETE DA SILVA LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Psicologia. Área de concentração: Comportamento e Cognição.
Orientadora: Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira.

SÃO CARLOS / SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Erinete da Silva Leite, realizada em 22/02/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira (UFSCar)

Profa. Dra. Raquel Chacon Ruiz Martinez (HSL)

Profa. Dra. Vanessa de Paula Soares Rachetti (UFRN)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia.

A todos aqueles que sempre acreditaram em mim e nunca me permitiram desistir.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do fornecimento de Bolsa de Mestrado (processo no. 88887.469373/2019-00). A pesquisa também contou com apoio financeiro da CAPES por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX; Código de Financiamento 001).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira pela maravilhosa orientação em todas as etapas do mestrado e por ter estado ao meu lado no momento mais difícil da minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro - número do processo: 88887.469373/2019-00

A Universidade por toda estrutura e a todo seu corpo docente pelo meu crescimento profissional

Aos meus colegas do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem por me ajudarem sempre que necessário.

Aos funcionários da secretaria do Programa por estarem sempre dispostos a ajudar nas questões burocráticas.

A minha filha Emmily Layza que sempre esteve ao meu lado.

Ao meu noivo e amigo Luiz Fabrizio, por ser tudo que é na minha vida.

Ao Prof. Dr. João dos Santos Carmo pelo amparo emocional e por me fazer ver a força que tenho.

Ao meu amigo Ronaldo de Oliveira Ramos, por me incentivar todos os dias da minha vida.

Wenn du lange in einen Abgrund blickst, blickt der Abgrund auch in dich hinein.

Friedrich Nietzsche

LEITE, E.S (2022). *Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) sobre a aprendizagem reversa em ratos: implementação do teste e exploração de diferenças entre machos e fêmeas*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, SP. 53 pp.

RESUMO

Diversos transtornos mentais são conhecidos pela rigidez comportamental, em especial o Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC), que se associa com disfunções nos córtices pré-frontais e resistência ao recondicionamento quando as regras ambientais são alteradas (aprendizagem reversa). Ratos tratados com meta-clorofenilpiperazina (mCPP) servem como modelo animal para o TOC, apresentando alterações como aumento de ansiedade e comportamentos compulsivos. Pouco se sabe, entretanto, sobre os efeitos da mCPP em fêmeas e sobre a flexibilidade comportamental. O presente estudo teve como objetivo a implementação do teste de aprendizagem reversa e a aplicação do mesmo em ratos tratados com mCPP, verificando potenciais diferenças de desempenho em relação ao modelo e entre sexos. Foram utilizados 145 ratos *Wistar* adultos (10-12 semanas de idade, 73 machos e 72 fêmeas) condicionados em um labirinto em T e, na sequência, reconicionados para o teste de aprendizagem reversa. No experimento 1, machos e fêmeas foram comparados entre si. Machos e fêmeas aprenderam igualmente sobre a posição do alimento no labirinto, diminuindo progressivamente as omissões, os erros cometidos e o tempo até alcançar o alimento. Diferenças entre os sexos foram observadas apenas na fase de aprendizagem reversa, com um número maior de erros cometidos pelas fêmeas nessas sessões, indicando menor flexibilidade comportamental para desvincular o comportamento de uma regra previamente aprendida e bem estabelecida. No experimento 2, administrações de mCPP ou salina ocorreram 20 min antes de cada sessão. 2 mg/Kg de mCPP produziu aumento das omissões e tempo de reação nas fêmeas, tanto na aprendizagem quanto na aprendizagem reversa, além de um tempo de reação maior para os machos apenas na aprendizagem reversa. Esses resultados sugerem um efeito motor e/ou motivacional da mCPP mais proeminente em fêmeas, que parece inclusive mais importante do que uma potencial indução de inflexibilidade comportamental relacionada ao TOC.

Palavras-chave: mCPP; aprendizagem reversa; rigidez comportamental; diferenças sexuais; modelo farmacológico; Transtorno Obsessivo-Compulsivo.

LEITE, E.S (2022). Effects of meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) on reversal learning in rats: test implementation and exploration of male-female differences. Master's Dissertation, Postgraduate Program in Psychology, Federal University of São Carlos, SP. 53 pp.

ABSTRACT

Several mental disorders are known for behavioral rigidity, especially Obsessive-Compulsive Disorder (OCD), which is associated with dysfunctions in the prefrontal cortices and resistance to reconditioning when environmental rules are changed (reversal learning). Rats treated with meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) are used as an animal model for OCD, showing changes such as increased anxiety and compulsive behaviors. Little is known, however, about the effects of mCPP in females and behavioral flexibility. The present study aimed to implement the reversal learning test and apply it to rats treated with mCPP, verifying potential performance differences in relation to the model and between sexes. 145 adult *Wistar* rats (10-12 weeks old, 73 males and 72 females) were conditioned in a T-maze and subsequently reconditioned for the reversal learning test. In experiment 1, males and females were compared to each other. Males and females learned alike about the position of food in the maze, progressively decreasing omissions, mistakes made, and the time to reach the food. Differences between sexes were observed only in the reversal learning phase, with a greater number of errors made by females in these sessions, indicating less behavioral flexibility to decouple the behavior from a previously learned and well-established rule. In experiment 2, mCPP or saline administrations occurred 20 min before each session. 2 mg/Kg of mCPP produced an increase in omissions and reaction time in females, both in learning and in reversal learning, in addition to a longer reaction time for males only in reversal learning. These results suggest a more prominent motor and/or motivational effect of mCPP in females even more important than the induction of OCD-related behavioral inflexibility.

Keywords: mCPP; reversal learning; behavioral rigidity; sexual differences; pharmacological model; Obsessive-Compulsive disorder.

Lista das Figuras

- Figura 1. Labirinto em T utilizado para o protocolo de aprendizagem reversa. 25
Figura 2. Caixa individual utilizada durante a Habituação A. 25
Figura 3. Delineamento Experimental. 25
Figura 4. Comparação entre ratos machos e fêmeas. 30
Figura 5. Efeitos da mCPP sobre as respostas dos machos 33
Figura 6. Efeitos da mCPP sobre as respostas das fêmeas 36

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Grupos e tratamentos utilizados para o Experimento 2

24

Lista de Siglas

5-HT2C	receptor de serotonina tipo 2c
ACC	córtex cingulado anterior
A1 a A5	dias de aprendizagem 1 a 5
AR	aprendizagem reversa
AR1 a AR3	dias de aprendizagem reversa 1 a 3
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª Edição
EPM	Erro Padrão da Média
LCE	labirinto em cruz elevado
LPA	Laboratório de Psicologia da Aprendizagem
mCPP	meta-clorofenilpiperazina
NC	núcleo caudado
OFC	córtex orbitofrontal
ISRSs	antidepressivos inibidores seletivos de recaptação de serotonina
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TOC	Transtorno Obsessivo-Compulsivo

Sumário

1 Introdução	14
1.1 O Transtorno Obsessivo-Compulsivo	15
1.2 Modelos Animais para TOC	17
1.3 A Aprendizagem Reversa	19
2 Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 Material e Métodos	23
3.1 Animais	23
3.2 Drogas	24
3.3 Equipamento	24
3.5 Delineamento Experimental	26
3.6 Análise de Dados	27
4 Resultados	28
4.1 Experimento 1 - Comparação da Aprendizagem Reversa entre os Sexos	28
4.2 Experimento 2 – Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa	30
4.2.1 <i>Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa em Machos</i>	30
4.2.2 <i>Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa em Fêmeas</i>	33
5 Discussão	37
6 Conclusões	43
7 Referências Bibliográficas	444
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar	53

1 Introdução

A capacidade de ajustar com flexibilidade nosso comportamento de acordo com alterações ambientais é crucial para nossa vida diária, mas para uma busca bem-sucedida de nossos objetivos precisamos manter também o comportamento diante de potenciais distratores. Assim, a flexibilidade e a estabilidade comportamental são processos componentes importantes para o controle cognitivo do comportamento (Armbruster et al., 2012). A flexibilidade comportamental se refere à capacidade de ajustar o comportamento de uma maneira dinâmica à alteração do ambiente, sendo que a falta dessa flexibilidade comportamental resulta em comportamentos rígidos (Gruner & Pittenger, 2017). A flexibilidade comportamental permite que um indivíduo trabalhe com eficiência para se desvincular de uma tarefa anterior, reconfigurar um novo conjunto de respostas e implementar esse novo conjunto de respostas para a tarefa em questão, sendo uma construção de propriedade da função executiva eficiente que é normalmente medida em laboratório usando paradigmas comportamentais de mudança de conjunto ou mudança de tarefa (Dajani & Uddin, 2015).

O protocolo de aprendizagem reversa mostra a dificuldade de se desvincular do comportamento em curso após uma mudança de contingência e reflete uma tendência de resposta habitual ou compulsiva. Isso sugere que a tarefa de condicionamento mede um conjunto de processos relacionados à inibição do comportamento automatizado, o que também pode ser relevante para o estudo de diversos transtornos mentais (Izquierdo et al., 2017). Em especial, destacam-se os transtornos conhecidos pela tomada problemática de decisões, ditas guiadas não pela análise/ponderação dos estímulos ambientais, mas por processos impulsivos ou pré-programados, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) e o Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC), por exemplo.

O TOC é caracterizado por padrões inadequados de cognição e comportamento repetitivos e inflexíveis. Na clínica, os indivíduos com TOC têm dificuldades em alternar entre os processos mentais para gerar respostas comportamentais adaptativas, especialmente no contexto de seus sintomas, denotando assim uma inflexibilidade comportamental (Gruner & Pittenger, 2017). Alguns estudos sobre o TOC apontam dificuldades em lembrar a realização de ações prévias (disfunção da memória para ações); dificuldades em determinar se uma ação foi apenas imaginada ou verdadeiramente realizada (p. ex. fechar o gás); e incapacidade de alterar regras aprendidas (Fontenelle, 2001). Por isso, portadores desse transtorno poderiam oferecer respostas bastante diferenciadas nos testes de aprendizagem reversa, a ponto que o mesmo pudesse ser usado como uma ferramenta de diagnóstico (Ghahremani et al., 2009). Em

um estudo realizado com 65 pacientes com TOC, 50 parentes de primeiro grau não afetados, e com 41 controles pareados, em que os participantes foram comparados usando uma tarefa de aprendizagem reversa, constatou-se que os portadores de TOC apresentam déficits proeminentes e persistentes na aprendizagem reversa (Tezcan et al., 2017). Esses déficits foram associados a sintomas clínicos de ruminação e dúvida (em pacientes) ou subclínicos (em parentes). Esses achados suportam a noção de que os sintomas do TOC estão associados à flexibilidade comportamental prejudicada.

1.1 O Transtorno Obsessivo-Compulsivo

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o TOC é uma condição psiquiátrica incapacitante caracterizada pela presença de pensamentos, imagens ou impulsos perturbadores e persistentes que são vivenciados como intrusivos e sem sentido (obsessivos) e que causam acentuada angústia ou ansiedade e/ou comportamentos/atos mentais intencionais repetitivos, excessivos (compulsivos), destinados a neutralizar essa angústia (APA, 2014). Mesmo reconhecendo a origem irreal ou imaginária de seus impulsos, o portador de TOC não consegue ou sofre ao tentar contê-los. As estimativas globais da prevalência do TOC mostram que as mulheres têm 1,6 vezes maior probabilidade de apresentar TOC em comparação aos homens, com uma taxa de prevalência ao longo da vida de 1,5% nas mulheres e 1,0% nos homens (Fawcett et al., 2020). A presença de dificuldade financeira está positivamente relacionada ao TOC, bem como uma pior qualidade de vida comparado aos controles saudáveis (Skapinakis et al., 2019). No entanto, raramente as pessoas procuram tratamento para o TOC, mas o fazem para psicopatologias relacionadas como ansiedade generalizada, depressão, transtorno do pânico, dependência de álcool ou outras drogas.

O TOC foi considerado um transtorno de ansiedade durante muito tempo, tendo sido realocado recentemente para um grupo nosológico independente no DSM-5 (APA, 2014), mas a ansiedade tem sua manifestação sintomática no comportamento obsessivo-compulsivo e seus marcadores neurobiológicos também estão presentes em pacientes com TOC. Tanto no TOC quanto nos transtornos de ansiedade, o medo é mantido pelos tipos de percepções exageradas da probabilidade e gravidade do dano resultante dos estímulos considerados aversivos (Abramowitz & Jacoby, 2014). Há também a semelhança fenomenológica em que as pessoas com TOC e aquelas com transtornos de ansiedade usam estratégias de fuga e evitação ativas e

passivas quando confrontadas com os estímulos aversivos. Os pacientes com TOC, em sua maioria, descrevem que realizam os rituais repetitivos para aliviar os sentimentos desagradáveis que resultam do aumento da ansiedade (Diniz et al., 2012). As principais comorbidades do TOC incluem: ansiedade, depressão e esquizofrenia, podendo ser explicadas pela alteração nos circuitos corticoestriatais e a sua modulação (Robbins et al., 2019).

O TOC tem sido associado a anomalias estruturais no córtex orbitofrontal (OFC), no córtex cingulado anterior (ACC) e nos núcleos da base, especialmente o núcleo caudado (NC) (Pujol et al., 2004; Menzies et al., 2008; Van den Heuvel et al., 2020). Sendo a região do OFC envolvida na aprendizagem guiada por recompensas e na tomada de decisão, em pessoas com TOC existe uma hiperatividade nessa área sendo relacionada com obsessões e compulsões (Beucke et al., 2013); já as regiões ACC e NC são hipoativas em pessoas com TOC, o que ocasionaria a inflexibilidade comportamental e os déficits na função executiva observados em avaliações neuropsicológicas nesses pacientes (Saxena & Rauch, 2000). Os neurotransmissores implicados no TOC incluem serotonina, dopamina e glutamato, conforme estudos de neuroimagem e farmacológicos (Van den Heuvel et al., 2020; Gráf, 2006). A eficácia dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) e da clomipramina no tratamento do TOC sugere que a neurotransmissão serotoninérgica tenha um papel central TOC (Bokorn & Anderson, 2014).

O tratamento do TOC é feito usualmente com terapia cognitivo-comportamental (TCC) e inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) – estudos multicêntricos separados, mostraram eficácia destes entre 40 – 60% no tratamento dos pacientes (Bloch et al., 2010; Öst, et al., 2015). A TCC parece modular os circuitos cognitivos fronto-límbico e dorsal trazendo melhoras na regulação do medo e da emoção (Thorsen et al., 2018). Os ISRSs podem ser particularmente apropriados para pacientes com disfunções do circuito afetivo fronto-límbico e ventral, pois estas áreas estão relacionadas aos mecanismos de medo e recompensa. No estudo de Shin e cols. 2014, pacientes com TOC que fizeram o uso de ISRS durante um período de 16 semanas tiveram uma restauração do equilíbrio ideal de redes cerebrais, principalmente em áreas frontoparietais.

1.2 Modelos Animais para TOC

Uma vez que o TOC é um transtorno heterogêneo e complexo, e devido à natureza cognitiva das obsessões, diferentes modelos animais são usados na tentativa de melhor compreender distintos aspectos e subtipos do TOC, com a modelagem dos comportamentos compulsivos sendo uma abordagem bastante comum (Diniz et al., 2012).

Modelos animais etológicos para TOC incluem a avaliação de comportamentos repetitivos ou instintivos que ocorrem durante períodos de conflito ou estresse. Nesse sentido, por exemplo, Reimer et al. (2015) buscaram entender se as diferenças individuais na expressão do comportamento de autolimpeza em ratos resultariam em variações na expressão de respostas incondicionadas e condicionadas de medo e comportamentos tipo-compulsivos. Dado que o comportamento de autolimpeza poderia ser um componente de todo o espectro de ansiedade e/ou distúrbios compulsivos, antes de cada teste comportamental ou análise neuroquímica realizada pelos autores, os ratos foram divididos em três grupos (autolimpeza baixa, intermediária ou alta), de acordo com a expressão do comportamento de autolimpeza no labirinto em cruz elevado (LCE). Os autores chegaram à conclusão de que ratos selecionados de acordo com a expressão de autolimpeza no LCE mostram desempenho similar em testes de medo incondicionado e condicionado, comportamento compulsivo e função sensorio-motora, indicando que o comportamento de autolimpeza, especificamente o observado no LCE, não estaria associado à ansiedade de forma geral, ou ao TOC mais especificamente.

Já em modelos animais farmacológicos para o TOC, busca-se induzir alterações comportamentais com o uso de drogas, sendo essas alterações semelhantes aos sintomas específicos do TOC em humanos, como perseveração, indecisão ou checagem compulsiva, bem como aumento da ansiedade (Diniz et al., 2012). A validade de construto desses modelos estaria baseada no fato de que esses comportamentos anormais seriam induzidos pela manipulação de sistemas de neurotransmissores que se acredita estarem relacionados com o TOC, principalmente a serotonina e a dopamina (Alonso et al., 2015). A disfunção nos córtices pré-frontais, semelhante ao que ocorre em humanos, sugeriria que a alteração comportamental produzida em animais também estaria ancorada em impulsividade (Georgiadou et al., 2012).

No final dos anos 1990, um modelo animal farmacológico para o TOC foi proposto com a administração de quimpirrole (agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3) em ratos. A droga fazia com que os animais visitassem compulsivamente alguns locais e objetos, tendo seu efeito bloqueado pelo tricíclico clomipramina, usado no tratamento de pacientes com TOC (Szechtman et al., 1998, 1999, 2001). De forma semelhante, foi demonstrado que ratos tratados com meta-clorofenilpiperazina (mCPP), um agonista não seletivo 5-HT_{2C}, adquirem alterações

de comportamento similares aos sintomas do TOC, como comportamento ritualístico de mastigação, excessiva autolimpeza e aumento de persistência no contexto da alternância recompensada do labirinto em T (Kreiss et al., 2013; Georgiadou et al., 2012; Tsaltas et al., 2005). A mCPP em humanos provoca aumento da ansiedade em indivíduos controle e exacerbação dos sintomas em pacientes com TOC (Zohar et al., 1987; Hollander et al., 1991). Já em roedores, a mCPP evoca comportamentos repetitivos que envolvem a ativação de áreas cerebrais homólogas às aquelas encontradas como disfuncionais em pacientes com TOC (Stark et al., 2006). Essas regiões, incluindo os córtices pré-frontal medial, orbitofrontal e cíngulo anterior, também estão envolvidas na memória, tomada de decisão e aprendizagem (Euston et al., 2012).

Nessa direção, Reimer et al. (2018) fizeram uso da mCPP como um modelo farmacológico de TOC, encontrando um aumento significativo no comportamento de autolimpeza tanto em ratos machos quanto fêmeas, mas com comprometimento da extinção do medo condicionado apenas em ratas, de forma dependente do ciclo estral. Esse achado sugere que, em roedores, tal processo de extinção está ligado tanto à sinalização dos hormônios sexuais quanto aos receptores 5-HT_{2C} no encéfalo. A extinção comportamental, junto com a aquisição de novos comportamentos, compõe o que chamamos de flexibilidade comportamental, um elemento significativo da aprendizagem reversa. Tendo como hipótese que a aprendizagem reversa estaria prejudicada em um modelo animal para TOC, no presente estudo os ratos foram tratados com mCPP (0,5 e 2,0 mg/kg) para avaliar possíveis déficits de aquisição e reversão de aprendizagem, levando em consideração a diferença entre sexos.

Há evidências de que machos e fêmeas aprendem e lembram de forma diferente, tanto devido a constituições diferentes do encéfalo desde estágios iniciais do desenvolvimento, quanto devido aos efeitos de esteroides sexuais. No estudo de Safari et al. (2021), ratos *Wistar* foram utilizados para investigar as diferenças sexuais na capacidade espacial e na plasticidade sináptica. De uma forma geral, os machos tiveram um desempenho melhor do que as fêmeas na tarefa do Labirinto Aquático de Morris, ficando evidente também diferenças de sexo na plasticidade e nas sinapses da via perfurante no giro dentado. Esses dados são consistentes com muitos outros trabalhos que mostram que os machos tiveram um desempenho melhor do que fêmeas em tarefas de aprendizagem espacial (Iachini et al., 2005; Blokland et al., 2006; Saucier et al., 2008). Uma diferença importante no aprendizado espacial e na memória entre ratos machos e fêmeas parece ser que eles usam diferentes abordagens de aprendizado que são controladas por diferentes áreas do cérebro. A estratégia preferencial dos machos é espacial,

dependente do hipocampo ao invés de uma estratégia de resposta dependente do estriado (Safari et al., 2021). Em contraste, as fêmeas preferem uma estratégia espacial apenas quando a concentração de estradiol aumenta em sua corrente sanguínea (Hawley et al., 2012).

O conhecimento sobre as diferenças sexuais na aprendizagem pode nos ajudar a prevenir e tratar com mais eficácia vários distúrbios relacionados a falhas no aprendizado ou extinção/substituição de contingências, onde há diferenciação de prevalência e até de sintomas por sexo. As mulheres portadoras de TOC, por exemplo, apresentam sintomas iniciados abruptamente após os 30 anos, são em sua maioria casadas e há uma maior comorbidade de transtornos alimentares, síndrome do pânico, depressão e obsessões agressivas; já os homens geralmente apresentam sintomas iniciados de forma gradual antes dos 30 anos, são em grande parte sozinhos, apresentam episódios hipomaniacos, obsessões sociais, sexuais e por simetria (Lensi et al., 1996). Por isso, ao se avaliar um modelo animal que proponha mimetizar tanto aspectos neurais como comportamentais humanos, é necessário detalhar se essas diferenças se estendem a diferenças entre sexos.

1.3 A Aprendizagem Reversa

A aprendizagem reversa pode ser estudada com um protocolo no qual os indivíduos são treinados para discriminar entre dois estímulos visuais ou locais espaciais, um dos quais é recompensado toda vez que é escolhido e o outro que não é. Após o sucesso da discriminação, o aprendizado fica demonstrado pela preferência pelo estímulo/local recompensado. Na sequência, os resultados associados aos dois estímulos são revertidos e os indivíduos são novamente treinados até que atendam a um critério de desempenho para a nova contingência (Izquierdo et al., 2017). Em outras palavras, troca-se a resposta reforçada e observa-se a “persistência” das respostas antigas (automáticas) nesse novo esquema. Este protocolo está intimamente ligado com a flexibilidade comportamental, que é descrita geralmente como uma das funções executivas, tendo como aspecto principal a capacidade de ajustar o comportamento em resposta à alteração do estímulo recompensado.

A rigidez comportamental, que é uma incapacidade espontânea de reter, modificar ou sustentar o comportamento adaptativo em resposta a alterações nas demandas situacionais, está associada a vários transtornos psiquiátricos, principalmente esquizofrenia, depressão, dependência e TOC. A elucidação das bases neurais subjacentes à flexibilidade comportamental

e aos processos constituintes, incluindo a inibição da resposta, pode ser de grande importância para a compreensão da etiologia e tratamento do comportamento inflexível aparente em tais transtornos (Granon & Floresco, 2009). Estudos de neuroimagem demonstram aumento de atividade no OFC e córtex pré-frontal medial (mPFC) em seres humanos realizando reversões de aprendizagem, bem como lesões nessas regiões podem ocasionar déficits na aprendizagem de reversão (Izquierdo et al., 2017; Remijnse et al., 2006; Tezcan et al., 2017).

Como dito anteriormente, a metodologia da aprendizagem reversa propõe condicionar os animais a um conjunto de contingências e depois substituí-las, de forma a estudar os erros cometidos pelos animais até que um novo condicionamento seja implantado. Essa metodologia foi extensamente analisada por Remmelink et al. (2016) considerando camundongos mutantes e com danos cerebrais como modelos experimentais para algumas psicopatologias humanas. Já Floresco et al. (2008), em seu estudo com ratos *Long Evans*, demonstrou que a inativação do OFC prejudicou a aprendizagem reversa, o que nos leva a sugerir que animais modelo para o TOC possam apresentar desempenho inferior nesse tipo de protocolo.

Uma das formas de se estudar aprendizagem reversa em roedores é utilizando-se um labirinto em formato de T, que tem sido amplamente utilizado em neurociência para estudos de aprendizado espacial e memória. A tarefa é baseada na natureza exploratória dos roedores para localizar alimentos de maneira rápida e eficiente. O modelo básico do labirinto fornece ao animal duas opções: braço esquerdo e braço direito. A tendência natural do roedor é a de explorar o braço não visitado, depois de ter conseguido a recompensa alimentar em um dos braços. Tolman et al. (1946) utilizaram o Labirinto em T para investigar a aprendizagem de inclinações e referências em ratos. Eles levantaram a hipótese de que o aprendizado animal incluía propósito e cognição. Seus resultados sugeriram que o comportamento aprendido no labirinto era uma disposição para orientar ou ir em direção à localização do objetivo. Esse comportamento é denominado alternância espontânea, tendo como referência à tendência natural dos ratos de explorar sequencial e sucessivamente lugares novos (Diniz et al., 2012). Nesse modelo, os ratos são privados de alimentos por 23h e podem correr no labirinto em forma de T, no qual ambas as extremidades dos braços do labirinto contém leite achocolatado. O número médio de escolhas feitas até que ocorra uma alternância é a principal medida (Yadin et al., 1991). A redução da alternância espontânea foi proposta como um modelo dos sintomas de perseveração e indecisão observados no TOC, respondendo farmacologicamente de maneira análoga ao comportamento compulsivo em humanos (Tsaltas et al., 2005).

Para a aprendizagem reversa tem-se operações específicas, tais como (1) detecção da mudança na contingência; (2) inibição de uma resposta aprendida previamente; (3) superação da "irrelevância aprendida"; e (4) nova aprendizagem associativa (Boulougouris et al., 2008). O rato deve aprender num primeiro momento onde encontrar o reforço (braço direito, por exemplo) e depois reaprender onde estará o reforço após a reversão (braço esquerdo). A hipótese do presente trabalho é que a metodologia de *Aprendizagem Reversa* possa detectar diferenças de reversão de aprendizagem entre os ratos da linhagem *Wistar* machos e fêmeas. Espera-se que para os ratos nos quais alterações do tipo TOC serão induzidos por mCPP, essa diferença na aprendizagem reversa seja ainda maior, pois a mCPP é um agonista não seletivo 5-HT_{2C}, que conforme estudo de Boulougouris et al., (2008) o agonismo desse receptor está ligado a uma rigidez comportamental. Além disso, em um estudo recente, Reimer et al. (2018) demonstraram que o comprometimento na retenção de extinção do medo foi observado apenas em fêmeas submetidas ao medo contextual, um tipo de aprendizagem reversa, sugerindo que as flutuações nos hormônios sexuais podem interagir com a serotonina e contribuir para o déficit de extinção do medo induzido pela mCPP. Considerando que ratos machos e fêmeas apresentam resultados de desempenho diferentes, e que as mulheres tem uma maior incidência de TOC em comparação aos homens (Fawcett et al., 2020), a hipótese do presente estudo se justifica em encontrar uma diferença entre machos e fêmeas mais pronunciada após o tratamento com mCPP.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Implantar o teste de aprendizagem reversa no laboratório, explorando uma possível diferença de resultados no teste em relação ao sexo e como resultado do tratamento com mCPP, um modelo animal farmacológico para o Transtorno Obsessivo-Compulsivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Implantar o protocolo de Aprendizagem Reversa no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem da UFSCar.
- Verificar possíveis diferenças de desempenho de ratos machos e fêmeas na Aprendizagem Reversa.
- Explorar possíveis diferenças de reversão de aprendizagem em ratos para o modelo farmacológico de TOC.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha (40 × 33 × 25 cm; divididos em grupos de 4) e ficaram alojados no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA), no Departamento de Psicologia da UFSCar. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (23 ± 1°C), com água *ad libitum*. O biotério setorial conta com um ciclo de iluminação artificial 12/12 h, com início do período claro às 7:00 h, e todos os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo. Todos os procedimentos seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (protocolo no. 3442130619 – ANEXO A)

Foram utilizados 145 ratos adultos (10-12 semanas de idade) da linhagem *Wistar*. A partir do início dos experimentos, os animais tiveram restrição alimentar prévia, conforme protocolo adaptado de Deacon & Rawlins (2006) e Ghods-Sharifi et al. (2008). Os animais permaneceram em suas caixas sem acesso a comida. Todos os dias, pela manhã, eles eram pesados (para controle da perda de peso corporal mantida em no máximo 20% - National Research Council, 2010) e passavam pela sessão experimental. 15 min após o término dos experimentos, os animais tinham acesso a ração em suas caixas moradia, por uma hora.

Foram utilizados ao todo 73 machos e 72 fêmeas, divididos em dois experimentos, da seguinte forma:

Experimento 1 - Comparação da Aprendizagem Reversa entre os Sexos

Foram utilizados 12 machos e 12 fêmeas submetidos ao teste de aprendizagem reversa para implantação/padronização do teste e avaliação de potenciais diferenças entre os sexos.

Experimento 2 - Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa

Foram utilizados 61 machos e 60 fêmeas, subdivididos em 5 grupos (Tabela 1), de acordo com o tratamento para avaliação dos efeitos da mCPP sobre a aprendizagem e a aprendizagem reversa.

Tabela 1

Grupos e tratamentos utilizados para o Experimento 2

Grupos	Tratamento na Aprendizagem	Tratamento na Reversão	Machos (n por grupo)	Fêmeas (n por grupo)
Grupo 1 – controle	Salina	Salina	13	12
Grupo 2	Salina	mCPP 0,5 mg/Kg	12	12
Grupo 3	Salina	mCPP 2,0 mg/Kg	12	12
Grupo 4	mCPP 0,5 mg/Kg	Salina	12	12
Grupo 5	mCPP 2,0 mg/Kg	Salina	12	12

3.2 Drogas

Foi utilizada a meta-clorofenilpiperazina (mCPP), agonista serotoninérgico não seletivo do receptor 5-HT_{2C}, nas doses de 0,5 e 2,0 mg/kg. A mCPP foi administrada intraperitonealmente em volume constante de 1,0 ml/kg, com volume ajustado ao peso de cada animal. Volume equivalente de salina fisiológica foi administrado para os grupos controle. As administrações ocorreram 20 min antes dos testes de aprendizagem e aprendizagem reversa. As doses e o tempo de espera foram selecionados com base em estudos anteriores nos quais a mCPP foi usada para induzir respostas semelhantes ao TOC em ratos (Reimer et al., 2018; Taguchi, 2018; Kawaoku, 2018).

3.3 Equipamento

O aparato experimental consiste em um labirinto no formato de T construído em acrílico preto, com três braços de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, com paredes de 30 cm de altura (Fig. 1). Tanto na extremidade do braço direito quanto do braço esquerdo o alimento apetitivo era acondicionado em uma pequena caixa acrílica de cor cinza escuro. Sobre o labirinto em T havia uma câmera de vídeo, para registro de cada sessão experimental. Todas as sessões de aprendizagem e de aprendizagem reversa foram filmadas, para arquivo. O labirinto foi limpo com álcool 20% e papel toalha, após cada tentativa, e entre um sujeito e outro.

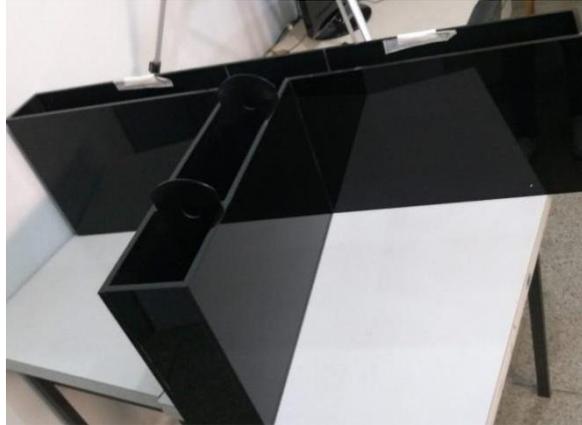


Figura 1. Labirinto em T utilizado para o protocolo de aprendizagem reversa.

3.4 Procedimentos

Habituação A: Os animais foram colocados diariamente em caixa individual com uma bolinha de NESCAU® cereal disponível (Fig. 2), que posteriormente seria utilizado como reforço no labirinto em T. Os animais permaneciam por 1 h na caixa e, após esse período, retornavam para a caixa moradia. Os animais que não comiam o reforço, retornavam para uma nova sessão de Habituação A no dia seguinte. Os animais que comiam o reforço eram, no dia seguinte, submetidos à Habituação B, no labirinto em T.



Figura 2. Caixa individual utilizada durante a Habituação A.

Habituação B: Os animais foram colocados diariamente no labirinto em T, com o reforço disponível no meio do labirinto e nos dois braços. Os animais permaneciam no aparato por um período de 10 minutos e, na sequência, retornavam para a caixa moradia. Os animais que não comiam o reforço retornavam para uma nova sessão de Habituação B no dia seguinte. Para os animais que comiam o reforço, no dia seguinte iniciava-se o protocolo de aprendizagem.

Fase de Aprendizagem: Os animais foram colocados pela cauda dentro do aparato, na parte inferior inicial do labirinto em T em 10 tentativas diárias, durante 5 dias. Nesta etapa, o reforço foi sempre apresentado na extremidade do braço direito (ou esquerdo) do labirinto. Foram avaliados o número de acertos, ou seja, o número de vezes em que o animal encontra o alimento; o número de erros, ou seja, o número de vezes em que o animal não encontrou o alimento; o número de omissões, ou seja, o número de vezes em que o animal não fez a tentativa, não entrando em nenhum dos dois braços do labirinto; e a latência para resposta, ou seja, o tempo que o animal levou até alcançar o alimento. O tempo para uma tentativa ser considerada como omissão foi fixado em 5 minutos.

Pausa: Após os 5 dias de aprendizado foi dado um intervalo de 48 horas antes do início da fase de aprendizagem reversa. Durante esse período, a privação alimentar de 23 h era mantida.

Fase de Aprendizagem Reversa: Os animais foram colocados pela cauda dentro do aparato, na parte inferior inicial do labirinto em T em 10 tentativas diárias, durante 3 dias. Nesta etapa, o reforço foi sempre apresentado na extremidade do braço oposto ao utilizado durante a fase de aprendizagem (direito ou esquerdo). Foram avaliados o número de acertos, erros e omissões, e a latência para resposta. O tempo para uma tentativa ser considerada como omissão foi fixado em 5 minutos. No primeiro dia de aprendizagem reversa, antes da primeira tentativa de reversão, foi realizada uma tentativa para avaliação da evocação da aprendizagem, com o reforço colocado no mesmo braço utilizado na fase de aprendizagem.

3.5 Delineamento Experimental

Os animais permaneceram no biotério setorial por pelo menos 4 dias para habituação. Neste protocolo adaptado Deacon & Rawlins (2006) e Ghods-Sharifi et al. (2008), antes de iniciar o experimento no labirinto em T, os animais foram privados de ração por um período de 23 horas. Após esse período, eles eram levados para uma sala adjacente à sala experimental onde eram pesados diariamente, logo após para sala de observação para dar início ao experimento. O protocolo utilizado para aprendizagem reversa foi composto por 3 fases:

Habituação (A e B), Aprendizagem (1, 2, 3, 4, e 5) e Aprendizagem reversa (1, 2 e 3) (Fig. 3). Todos os animais foram privados de ração por um período de 23 horas a partir do dia anterior ao início do procedimento de habituação.



Figura 3. Delineamento Experimental.

3.6 Análise de Dados

Os dados são apresentados como média \pm EPM. Para o experimento 1 e 2, todas as comparações foram realizadas com análises de variância (ANOVAs) de duas vias com medidas repetidas, com um fator para fase do procedimento (sessão: A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5, ou AR1 \times AR2 \times AR3) e outro fator para grupo (sexo: Machos \times Fêmeas, ou tratamento: sal/sal \times sal/mCPP0,5 \times sal/mCPP2,0 \times mCPP0,5/sal \times mCPP2,0/sal). Após as ANOVAs seguiu-se, no caso de significância estatística, o teste Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Experimento 1 - Comparação da Aprendizagem Reversa entre os Sexos

Nesse experimento foram exploradas potenciais diferenças entre os sexos na aprendizagem e aprendizagem reversa para ratos machos e fêmeas no labirinto em T. Na Figura 4, são apresentados os números de acertos, erros e omissões, assim como os tempos de reação dos machos e fêmeas submetidos ao protocolo de aprendizagem e aprendizagem reversa no labirinto em T.

Para o número de acertos durante a aprendizagem (Fig. 4A), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,119} = 32,79$, $p < 0,05$), mas não revelou efeito significativo para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,88} = 0,17$, $p > 0,05$) ou para interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{4,119} = 0,42$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 e em A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). Para o número de acertos durante a aprendizagem reversa (Fig. 4A), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,71} = 113,79$, $p < 0,05$) e para a interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{2,71} = 3,30$, $p < 0,05$), mas não revelou efeito significativo para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,44} = 3,42$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em AR2 e AR3 em relação a AR1 e em AR3 em relação a AR2, tanto para machos quanto para fêmeas ($p < 0,05$). O teste de Newman-Keuls também indicou maior número de respostas corretas para machos em relação às fêmeas nas sessões AR1 e AR2 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas em AR3 ($p > 0,05$).

Para o número de erros durante a aprendizagem (Fig. 4B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas também mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,119} = 33,56$, $p < 0,05$) e não revelou efeito significativo para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,88} = 1,74$, $p > 0,05$), ou para interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{4,119} = 0,94$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou uma redução significativa do número de erros em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 e em A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). Para o número de erros durante a aprendizagem reversa (Fig. 4B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,71} = 113,79$, $p < 0,05$) e para a interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{2,71} = 3,30$, $p < 0,05$), mas

não para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,44} = 3,42$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa de erros em AR2 e AR3 em relação a AR1 e em AR3 em relação a AR2, tanto para machos quanto para fêmeas ($p < 0,05$). O teste de Newman-Keuls também indicou maior número de erros das fêmeas em relação aos machos nas sessões AR1 e AR2 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas em AR3 ($p > 0,05$).

Para o número de omissões durante a aprendizagem (Fig. 4C), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não mostrou diferenças significativas para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,88} = 1,77$, $p > 0,05$), para o fator sessão (A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5; $F_{4,119} = 1,91$, $p > 0,05$), ou para a interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{4,119} = 0,51$, $p > 0,05$). Não foram observadas omissões para machos ou fêmeas durante a aprendizagem reversa (Fig. 4C).

Para o tempo de reação durante a aprendizagem (Fig. 4D), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5; $F_{4,119} = 28,29$, $p < 0,05$), mas não revelou efeito significativo para o fator sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,88} = 1,42$, $p > 0,05$), ou para interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{4,119} = 0,11$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do tempo de reação em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1, em A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). Para o tempo de reação durante a aprendizagem reversa (Fig. 4D), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (AR1 \times AR2 \times AR3; $F_{2,71} = 5,29$, $p < 0,05$), mas não para a sexo (Machos \times Fêmeas; $F_{1,44} = 2,11$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (sessão \times Sexo; $F_{2,71} = 1,03$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou redução significativa do tempo de reação em AR3 em relação a AR2 e AR1 ($p < 0,05$).

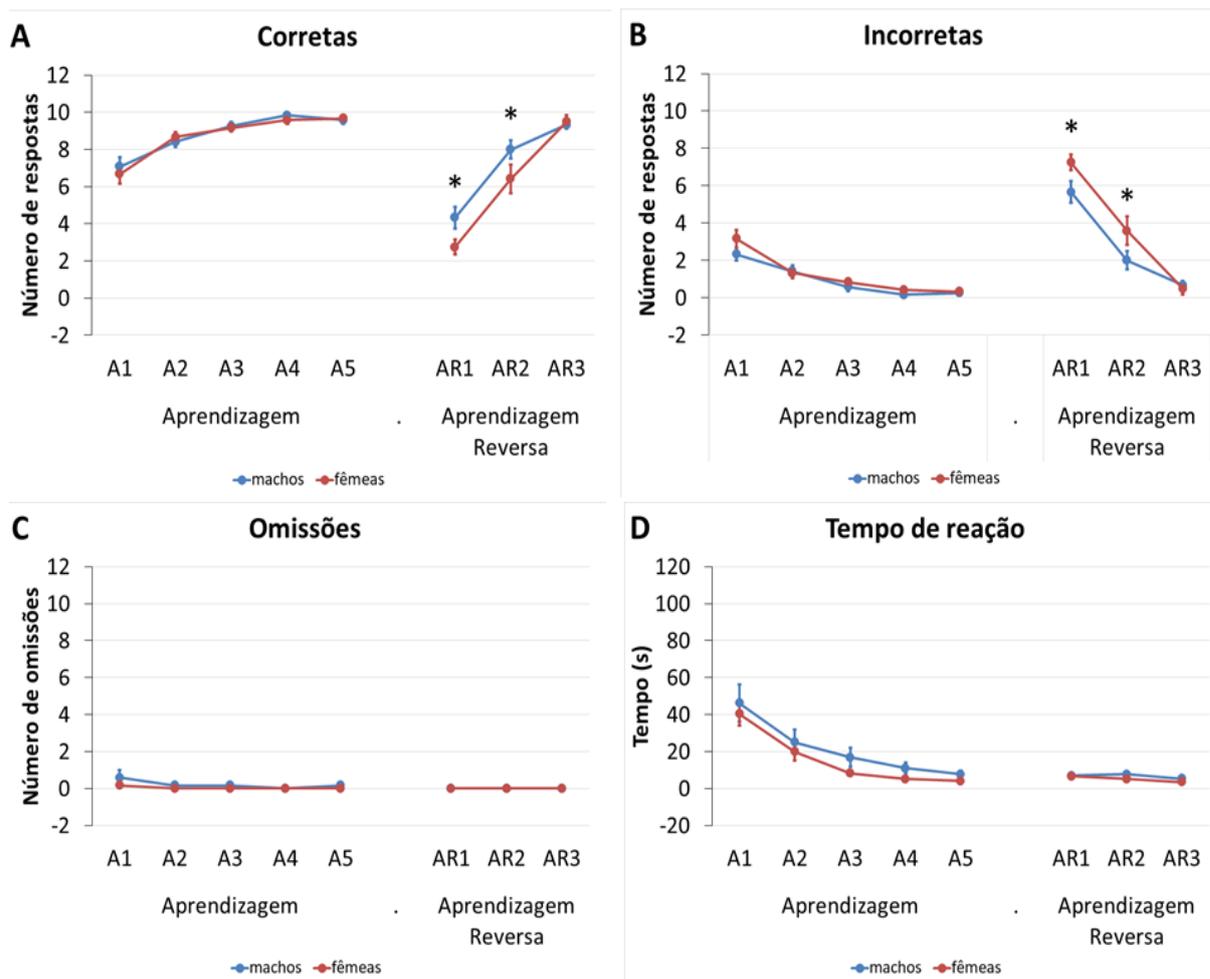


Figura 4. Comparação entre ratos machos e fêmeas para respostas corretas (A), incorretas (B), omissões (C) e tempo de reação (D) ao longo do processo de aprendizagem (A1 a A5) e durante a aprendizagem reversa (AR1 a AR3).

Nota: Os ratos foram condicionados a encontrar o alimento em um dos braços do Labirinto em T e, na fase de aprendizagem reversa, o alimento era trocado para o lado oposto. Os pontos representam as médias de 12 animais em 10 tentativas por sessão e as barras representam o erro padrão da média. As médias para a aprendizagem ou aprendizagem reversa foram analisadas por ANOVAs de duas vias com medidas repetidas; no caso de diferenças significativas foi utilizado o teste post-hoc de Newman-Keuls. * indica $p < 0,05$ entre machos e fêmeas. (A) média dos acertos, (B) média dos erros, (C) média das omissões de resposta, (D) média dos tempos até completar o percurso, contabilizando apenas tentativas com erros ou acertos.

4.2 Experimento 2 – Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa

4.2.1 Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa em Machos

Nesse experimento, foram avaliados os efeitos da mCPP sobre a aprendizagem (5 dias) e aprendizagem reversa (3 dias) em ratos no labirinto em T. Na Figura 5 são apresentados os números de acertos, erros e omissões, assim como o tempo de reação, dos machos submetidos

ao protocolo de aprendizagem e aprendizagem reversa no labirinto em T dos 5 diferentes grupos.

Para o número de acertos durante a aprendizagem (Fig. 5A), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,304} = 72,96$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento ($sal \times mCPP$ 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,224} = 0,92$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{4,119} = 1,04$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1, de A3, A4 e A5 em relação a A2 e de A4 e A5 em relação a A3 ($p < 0,05$). Para o número de acertos durante a aprendizagem reversa (Fig. 5A), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,182} = 178,11$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento ($sal \times mCPP$ 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,112} = 0,29$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{8,182} = 0,79$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em AR2 e AR3 em relação a AR1, e em AR3 em relação a AR2 ($p < 0,05$).

Para o número de erros durante a aprendizagem (Fig. 5B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas também mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,304} = 28,89$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento ($sal \times mCPP$ 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,224} = 0,92$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{16,304} = 0,60$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do número de respostas incorretas em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 e de A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). Para o número de erros durante a aprendizagem reversa (Fig. 5B), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,182} = 171,16$, $p < 0,05$). Na aprendizagem reversa, também não houve efeito significativo para tratamento ($sal \times mCPP$ 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,112} = 1,02$, $p > 0,05$) ou interação entre os fatores (tratamento e sessão; $F_{8,182} = 0,53$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do número de respostas erradas em AR2 e AR3 em relação a AR1, e de AR3 em relação a AR2 ($p < 0,05$).

Para o número de omissões durante a aprendizagem (Fig. 5C), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,304} = 14,71$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento ($sal \times mCPP$ 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,224} = 1,04$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{16,304} = 0,75$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa

do número de omissões entre as sessões A3, A4 e A5 e a sessão A1; e entre A4 e A5 e as sessões A2 e A3 ($p < 0,05$). Para o número de omissões durante a aprendizagem reversa (Fig. 5C), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,182} = 4,84$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para tratamento ($sal \times mCPP\ 0,5 \times mCPP\ 2,0$; $F_{4,112} = 1,87$, $p > 0,05$) ou interação (tratamento \times sessão; $F_{8,182} = 1,87$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls apontou diminuição das omissões em AR2 e AR3 em relação a AR1 ($p < 0,05$).

Para o tempo de reação durante a aprendizagem (Fig. 5D), ANOVA de duas vias com medidas repetidas, mostrou um efeito significativo no fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,291} = 42,23$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para tratamento ($sal \times mCPP\ 0,5 \times mCPP\ 2,0$; $F_{4,212} = 1,65$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{16,291} = 0,77$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do tempo de reação entre A2, A3, A4 e A5 em relação a A1; de A3, A4 e A5 com relação a A2; e de A4 e A5 em relação a A3 ($p < 0,05$). Para o tempo de reação durante a aprendizagem reversa (Fig. 5D), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para sessão ($AR1 \times AR2 \times AR3$; $F_{2,182} = 21,05$, $p < 0,05$), para tratamento ($sal \times mCPP\ 0,5 \times mCPP\ 2,0$; $F_{4,112} = 9,95$, $p < 0,05$), assim como interação significativa entre tratamento e as sessões ($F_{8,182} = 4,32$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls apontou uma diminuição do tempo de reação entre AR2 e AR3 em relação à AR1 apenas para o grupo $sal/mCPP2,0$ ($p < 0,05$). O teste de Newman-Keuls também apontou maior tempo de reação do grupo $sal/mCPP2,0$ em relação aos demais grupos em AR1, AR2 e AR3 ($p < 0,05$).

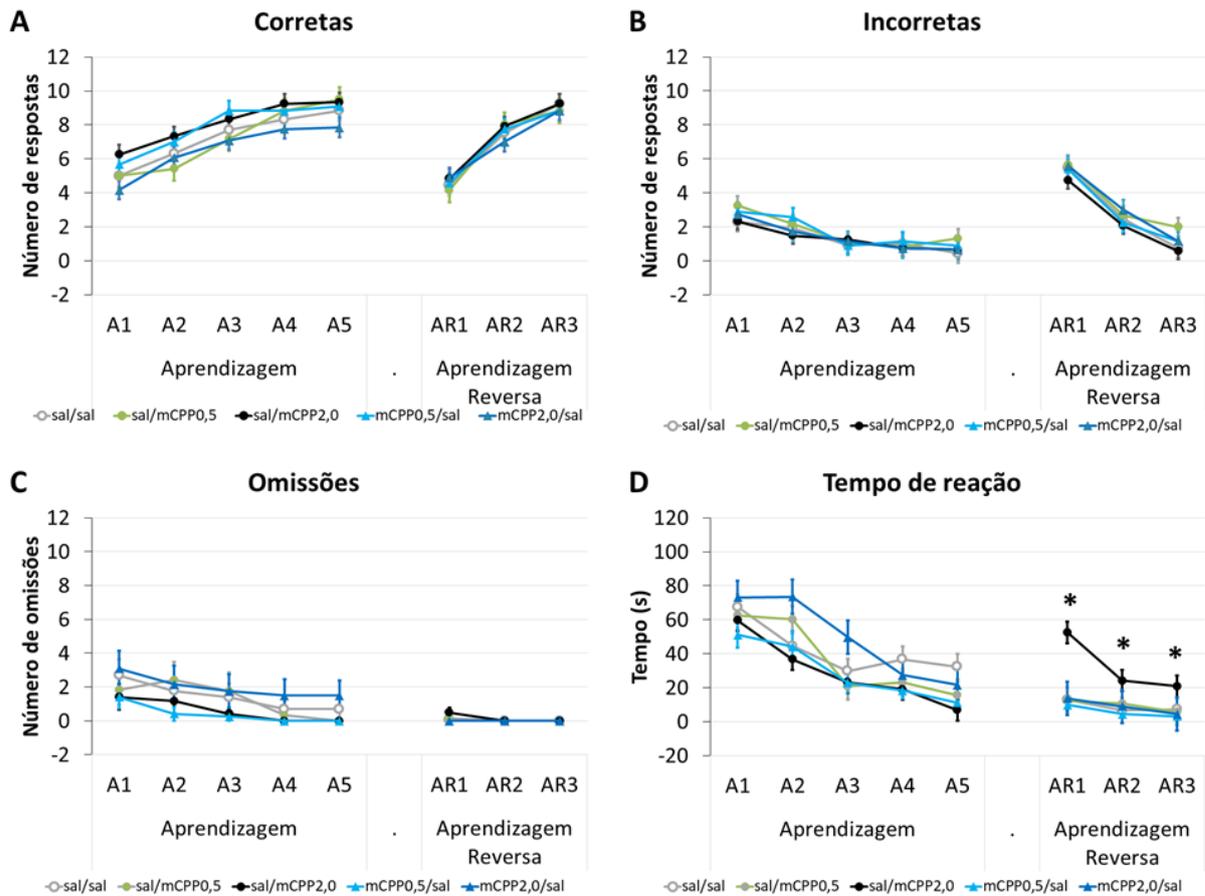


Figura 5. Efeitos da mCPP sobre as respostas corretas (A), incorretas (B), omissões (C) e tempo de reação (D) dos machos ao longo do processo de aprendizagem (A1 a A5) e durante a aprendizagem reversa (AR1 a AR3).

Nota: Os animais receberam, nos dias de aprendizado e aprendizagem reversa, respectivamente, salina e salina (sal/sal), salina e mCPP 0,5 mg/kg (sal/mCPP0,5), salina e mCPP 2,0 mg/kg (sal/mCPP 2,0), mCPP 0,5 mg/kg e salina (mCPP 0,5/sal), mCPP 2,0 mg/kg e sal (mCPP 2,0/sal). Os pontos representam as médias de 12 ou 13 animais em 10 tentativas por sessão e as barras representam o erro padrão da média. As médias para a aprendizagem ou aprendizagem reversa foram comparadas com ANOVAs de duas vias para medidas repetidas seguidas, no caso de significância estatística, pelo teste de Newman-Keuls. * indica $p < 0,05$ para o grupo sal/mCPP 2,0 em relação ao grupo controle (sal/sal).

4.2.2 Efeitos da mCPP sobre a Aprendizagem Reversa em Fêmeas

Nesse experimento foram avaliados os efeitos da mCPP sobre a aprendizagem (5 dias) e aprendizagem reversa (3 dias) nas ratas no labirinto em T. Na Figura 6 são apresentados os números de acertos, erros e omissões, assim como o tempo de reação, das fêmeas submetidas ao protocolo de aprendizagem e aprendizagem reversa no labirinto em T dos 5 diferentes grupos.

Para o número de acertos durante a aprendizagem (Fig. 6A) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,299} = 82,53$, $p < 0,05$). Houve um efeito significativo para o fator tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,299} = 9,90$, $p < 0,05$), mas não para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{4,299} = 0,69$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 ($p < 0,05$) e de A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou diminuição significativa do número de respostas corretas do grupo mCPP 2,0/sal em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Para o número de acertos durante a aprendizagem reversa (Fig. 6A) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (AR1 \times AR2 \times AR3; $F_{4,179} = 134,54$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,179} = 2,48$, $p > 0,05$), mas houve interação entre os fatores tratamento e sessão (tratamento \times sessão; $F_{4,179} = 0,69$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou aumento significativo do número de respostas corretas em AR2 e AR3 em relação a AR1 para todos os grupos ($p < 0,05$) e de AR3 em relação a AR2 para os grupos sal/sal, sal/mCPP 2,0, mCPP 0,5/sal ($p < 0,05$). O teste de Newman-Keuls também indicou diminuição significativa do número de respostas corretas do grupo sal/mCPP 2,0 em relação aos grupos sal/sal e sal/mCPP 0,5 ($p < 0,05$).

Para o número de erros durante a aprendizagem (Fig. 6B) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,299} = 57,19$, $p < 0,05$). Não houve efeito significativo para o fator tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,224} = 0,92$, $p > 0,05$) ou para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{4,304} = 0,60$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do número de respostas incorretas em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 e de A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). Para o número de erros durante a aprendizagem reversa (Fig. 6B) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (AR1 \times AR2 \times AR3; $F_{4,179} = 113,49$, $p < 0,05$), com interação significativa entre os fatores tratamento e sessão (tratamento \times sessão; $F_{4,179} = 4,84$, $p < 0,05$), mas sem efeito para tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,110} = 0,99$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do número de respostas incorretas em AR2 e AR3 em relação a AR1 para todos os grupos ($p < 0,05$) e de AR3 em relação a AR2 para os grupos sal/sal e mCPP 0,5/sal ($p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou uma diminuição na quantidade de respostas erradas em AR1 para o grupo sal/mCPP 2,0 em relação aos grupos

sal/sal, mCPP 0,5/sal e sal/mCPP 0,5 ($p < 0,05$) e para o grupo mCPP 2,0/sal em relação ao grupo sal/sal ($p < 0,05$).

Para o número de omissões durante a aprendizagem (Fig. 6C), a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,299} = 10,29$, $p < 0,05$). Houve um efeito significativo para o fator tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,299} = 7,28$, $p < 0,05$), mas não para a interação entre os fatores (tratamento \times sessão; $F_{4,299} = 0,76$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou uma diminuição significativa de omissões em A3, A4 e A5 em relação a A1 ($p < 0,05$) e A2 ($p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou aumento na quantidade de omissões para o grupo mCPP 2,0/sal em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Para o número de omissões durante a aprendizagem reversa (Fig. 6C) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (AR1 \times AR2 \times AR3; $F_{4,179} = 4,24$, $p < 0,05$), com interação entre os fatores tratamento e sessão ($F_{4,179} = 3,37$, $p < 0,05$). Também houve efeito significativo para o fator tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,110} = 4,56$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do número de omissões em AR2 e AR3 em relação a AR1 ($p < 0,05$), e de AR3 em relação a AR2 ($p < 0,05$), apenas no grupo sal/mCPP 2,0. O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou aumento de omissões em AR1 e AR2 para o grupo sal/mCPP 2,0 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Para o tempo de reação durante a aprendizagem (Fig. 6D) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, mostrou efeito significativo para o fator sessão ($A1 \times A2 \times A3 \times A4 \times A5$; $F_{4,283} = 25,81$, $p < 0,05$). Houve efeito significativo para tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,204} = 5,91$, $p < 0,05$), mas sem interação entre os fatores tratamento e sessão ($F_{16,283} = 0,63$, $p > 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou uma diminuição significativa do tempo de reação em A2, A3, A4 e A5 em relação a A1 ($p < 0,05$) e de A3, A4 e A5 em relação a A2 ($p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou aumento do tempo de reação para o grupo mCPP 2,0/sal em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Para o tempo de reação durante a aprendizagem reversa (Fig. 6D) a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo para o fator sessão (AR1 \times AR2 \times AR3; $F_{4,178} = 20,52$, $p < 0,05$), com interação entre os fatores tratamento e sessão ($F_{4,178} = 8,93$, $p < 0,05$). Também houve efeito significativo do tratamento (sal \times mCPP 0,5 \times mCPP 2,0; $F_{4,109} = 8,94$, $p < 0,05$). O teste post hoc de Newman-Keuls indicou diminuição significativa do tempo em AR2 e AR3 em relação a AR1 ($p < 0,05$) apenas para o grupo sal/mCPP 2,0. O teste post hoc de Newman-Keuls também indicou aumento do tempo de reação para o grupo sal/mCPP 2,0 em relação aos demais

grupos em AR1 e AR2 ($p < 0,05$) e em relação aos grupos sal/sal e mCPP 0,5/sal em AR3 ($p < 0,05$).

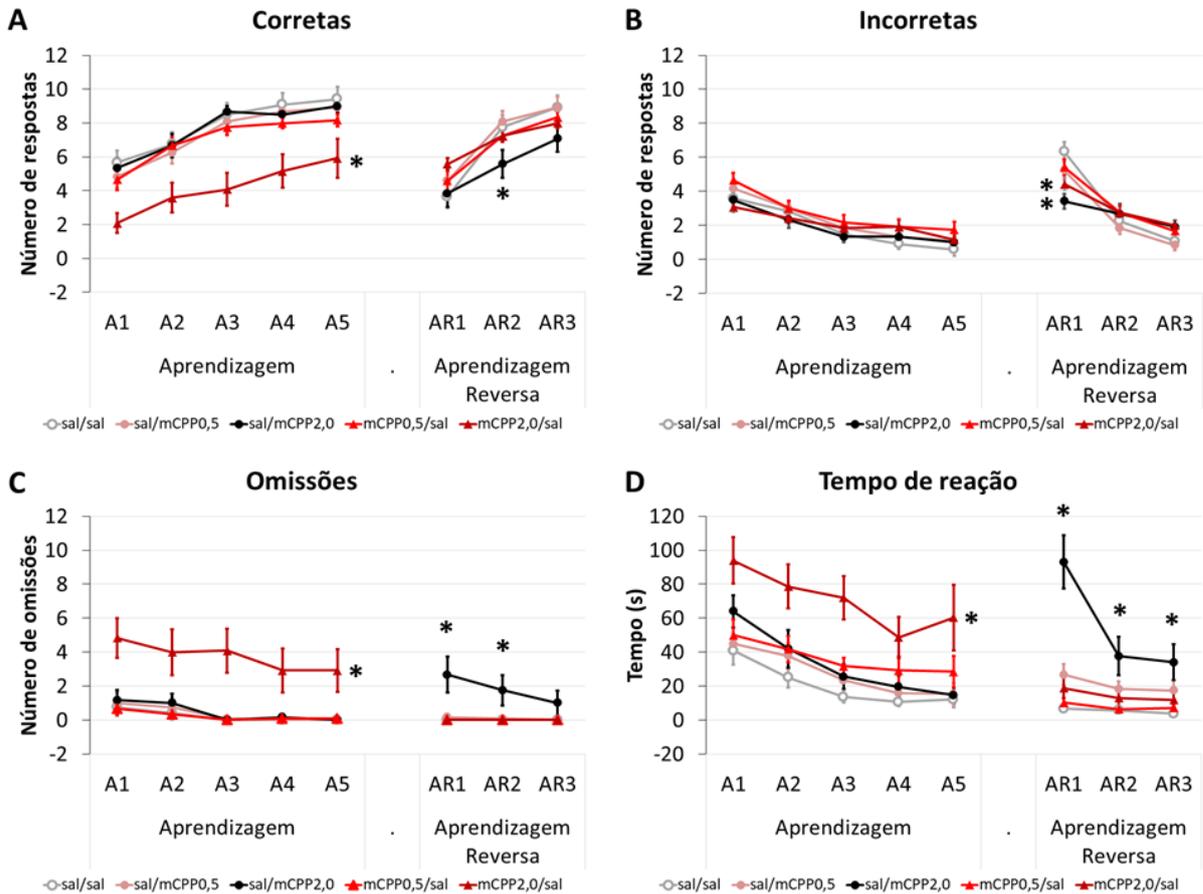


Figura 6. Efeitos da mCPP sobre respostas corretas (A), incorretas (B), omissões (C) e tempo de reação (D) das fêmeas ao longo do processo de aprendizagem (A1 a A5) e durante a aprendizagem reversa (AR1 a AR3).

Nota: Os animais receberam, nos dias de aprendizado e aprendizagem reversa, respectivamente, salina e salina (sal/sal), salina e mCPP 0,5 mg/kg (sal/mCPP0,5), salina e mCPP 2,0 mg/kg (sal/mCPP 2,0), mCPP 0,5 mg/kg e salina (mCPP 0,5/sal), mCPP 2,0 mg/kg e sal (mCPP 2,0/sal). Os pontos representam as médias de 12 animais em 10 tentativas por sessão e as barras representam o erro padrão da média. As médias para a aprendizagem ou aprendizagem reversa foram comparadas com ANOVAs de duas vias para medidas repetidas seguidas, no caso de significância estatística, pelo teste de Newman-Keuls. * indica $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (sal/sal).

5 Discussão

O trabalho teve como objetivos iniciais: 1. implementar o teste de *Aprendizagem Reversa* no laboratório; 2. verificar se encontraríamos diferenças na reversão de aprendizagem entre os ratos da linhagem *Wistar* machos e fêmeas; 3. investigar se para os animais modelo para o TOC induzido por mCPP observaríamos prejuízos na reversão da aprendizagem com diferenças entre sexos ainda mais pronunciadas. Na aprendizagem reversa, é testada a flexibilidade comportamental dos animais, uma habilidade que se observa prejudicada em transtornos psiquiátricos humanos como esquizofrenia, depressão, dependência e TOC (Brigman et al., 2010; Adler et al., 2020; Calu et al., 2007; Benzina et al., 2021). A aprendizagem reversa é um paradigma muito utilizado para medir a flexibilidade comportamental, ainda com poucos trabalhos em animais machos e fêmeas da linhagem *Wistar* modelo para o TOC, sendo o nosso estudo um dos primeiros na área. No experimento 1, as fêmeas apresentaram pior desempenho do que os machos na Aprendizagem Reversa, denotando uma menor flexibilidade comportamental. Já no experimento 2, os machos tratados com mCPP 2,0 mg/Kg apresentaram aumento do tempo de reação na fase de aprendizagem reversa, enquanto as fêmeas apresentaram aumento do tempo de reação e número de omissões e diminuição dos acertos tanto na aprendizagem quanto na reversão.

A implementação do teste de aprendizagem reversa no LPA foi realizada com o objetivo de explorar, na sequência, uma possível diferença de resultados nesse teste, associada primeiramente ao sexo e, depois, ao tratamento com mCPP. A implementação do protocolo experimental foi baseada em Deacon & Rawlins (2006) e Ghods-Sharifi et al. (2008), com adaptações necessárias ao desenho experimental, que foram quanto ao tempo necessário para concluir a tentativa (alteração de 2 min para 5 min) e quanto à medida experimental. O labirinto em T é utilizado para medir a alternância espontânea e aprendizagens dependentes do hipocampo, mas, em nosso estudo, utilizamos uma tarefa de aprendizagem reversa, que analisa a flexibilidade comportamental, dependente do córtex orbitofrontal. No início, não foi utilizada privação alimentar. No experimento de Remmelink et al. (2016), os animais adquiriram um novo comportamento sem necessitar de privação alimentar prévia. No presente estudo, porém, os animais não ingeriam o reforço apetitivo, inicialmente composto por iscas de cenoura ou banana, normalmente atrativos para os ratos (Galef Jr, 1995; Morrow et al., 2011; Buckley & Rasmussen, 2014; Morrow et al., 2015). Estudos semelhantes usaram o cereal Froot Loops® (McDonald & White, 1995; Ely et al., 1997; Pettenuzzo et al., 2008); decidimos, então, tentar

o cereal Nescau Balls®, com característica mais padronizada em relação a cor, sabor, formato e tamanho e menor custo. Usando este alimento, os animais ainda não ingeriam o reforço sem privação alimentar prévia. Testamos, então, a privação alimentar, que foi aumentada gradativamente de 16 até 23 horas, quando os animais passaram a aceitar o reforço. O critério de aprendizado utilizada foi uma taxa de acertos de 80% em 10 tentativas diárias; os animais geralmente atingiam essa medida no 3º dia de Aprendizagem e, quando o reforço era invertido de lado no Labirinto em T, na Aprendizagem Reversa, os animais atingiam 80% de acertos já no 2º dia.

No experimento 1, foi possível atestar a efetividade do protocolo desenvolvido, permitindo o estudo da aprendizagem reversa no laboratório. Cinco sessões de aprendizagem (com 10 tentativas cada) mostraram-se suficientes para gerar aprendizado – demonstrado pelo aumento do número de acertos ao longo dos dias até atingir o máximo nas seções 4 e 5, enquanto os erros e omissões diminuíram até praticamente desaparecerem nas seções 4 e 5. A utilização de cinco sessões para a fase de aprendizagem está dentro do que é encontrado em experimentos semelhantes com ratos (Tsaltas et al., 2005; Deibel et al., 2017). O tempo de reação diminuiu com o passar das sessões, até ficar estável em cerca de 10 s. Essa diminuição é comumente reportada na literatura (Blokland, 1998; Tsaltas et al., 2005; Boulougouris et al., 2007). Três sessões de aprendizagem reversa foram suficientes para observar o desafio da reversão de aprendizagem, com uma queda drástica do número de acertos (e aumento do número de erros) na primeira sessão. De fato, o desempenho na aprendizagem reversa foi pior do que o observado na primeira sessão de aprendizagem, como já descrito em outros estudos (McAlonan & Brown, 2003; Boulougouris et al., 2007; Ghods-Sharifi et al., 2008). A recuperação de desempenho com a desvinculação do comportamento da regra anterior e aprendizagem da nova contingência de reforçamento foi rapidamente observada entre as sessões e com efeito máximo já na terceira sessão, com restabelecimento de desempenho similar ao apresentado no final da fase de aprendizagem. Por outro lado, diferente da fase de aprendizagem, omissões não foram observadas e o tempo de reação permaneceu baixo durante toda a fase de aprendizagem reversa. Assim, considerando os resultados alcançados, o protocolo foi implementado com sucesso.

Ainda no experimento 1, exploramos potenciais diferenças entre machos e fêmeas na Aprendizagem e Aprendizagem Reversa. Os animais machos e fêmeas aprenderam igualmente sobre a posição do alimento no Labirinto em T, diminuindo progressivamente as omissões, erros cometidos e o tempo até alcançar o alimento. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Lucon-Xiccato & Bisazza (2014) em seu experimento de aprendizagem com

peixes machos e fêmeas da espécie *Poecilia reticulata* (lebiste ou barrigudinho). Nesse estudo, os peixes foram inicialmente treinados em uma tarefa de discriminação de cores (em uma grade verde com 48 orifícios, havia 2 cobertos com discos vermelho ou amarelo; sob um deles era escondido um alimento) e a aprendizagem de discriminação foi adquirida com a mesma rapidez por machos e fêmeas. Milad et al. (2009), em seu experimento de medo condicionado com ratos machos e fêmeas, também não observaram diferenças associadas ao sexo durante a fase de condicionamento, com os animais não diferindo em aprendizagem do medo nem mesmo quando considerada a fase do ciclo estral nas fêmeas.

Quando a recompensa alimentar teve seu lado invertido, houve um grande aumento no número de tentativas erradas, mas esses erros diminuíram nos dias subsequentes. Diferenças na aprendizagem reversa relativas ao sexo foram observadas no 1º e 2º dias, com um número maior de erros (e menor de acertos) cometidos pelas fêmeas nessas sessões. O melhor desempenho dos machos em relação às fêmeas, nos dois primeiros dias de reversão de aprendizagem, foi diferente dos achados de Lucon-Xiccato & Bisazza (2014) com peixes. Em seu experimento de aprendizagem reversa de discriminação, conduzido em uma única sessão com 10 tentativa para cada animal (14F e 14M), peixes machos mostraram o dobro de erros em relação às fêmeas antes de aprender a associação reversa entre cor-alimento. Na reversão de aprendizagem em série, com alternância de reversão de critério e contingências ocorrendo várias vezes no treinamento, os machos ainda apresentaram piores resultados em comparação às fêmeas. Os resultados apresentados aqui concordam com os achados da revisão de literatura feita por Dalla & Shors (2009), onde as fêmeas mostraram maior retenção do aprendido e uma dificuldade maior na extinção do comportamento nos experimentos de: condicionamento de piscar de olhos; sobressalto potencializado pelo medo; teste do sobressalto intensificado por luz; evitação ativa e reforçamento diferencial de baixa taxa. Tais resultados em ratos concordam também com o estudo de Reimer et al. (2018), em que foram avaliadas a autolimpeza induzida por mCPP em machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral e a extinção do medo condicionado ao contexto e ao som. Reimer et al. (2018) observaram que o pior desempenho das fêmeas na retenção de medo contextual foi dependente da fase estral e particularmente mais pronunciado durante as fases de baixa hormonal (metaestro e diestro).

A diferença observada entre machos e fêmeas durante a aprendizagem reversa não parece relacionada ao tempo necessário para realização de cada tentativa ou a alguma diferença locomotora, uma vez que não encontramos diferenças nas omissões (praticamente inexistentes) ou no tempo de reação para machos e fêmeas. O maior número de erros cometidos pelas fêmeas

indica menor flexibilidade (maior rigidez comportamental) para desvincular o comportamento de uma regra previamente aprendida e bem estabelecida, sugerindo a prevalência de comportamento habitual por mais tempo (LaClair et al., 2019; Aguirre et al., 2020). As diferenças observadas refletem um atraso, mais do que algo permanente, visto que as fêmeas param de errar na terceira sessão de AR, passando a exibir um comportamento similar àquele apresentado pelos machos. Influências hormonais podem contribuir para a diferença de desempenho entre machos e fêmeas e precisam ser exploradas em estudos futuros, com avaliação, por exemplo, da influência do ciclo estral sobre a aprendizagem reversa – uma limitação do nosso estudo. Diferenças de desempenho em outras tarefas, como aumento da ansiedade no Labirinto em T Elevado (Gouveia et al., 2004), nível de ansiedade menor no Campo Aberto (O'Leary et al., 2013), menor ansiedade na Caixa Claro-escuro (Zuluaga et al., 2005), menor vocalização no teste de Vocalização Ultrassônica (Machado Figueiredo et al., 2019), evocação do comportamento de fuga no modelo de Hipóxia (Batistela et al., 2021), aumento da resposta defensiva condicionada no teste Interação Presa-Predador (Pentkowski et al., 2018), nível aumentado de medo e ansiedade no Risky Closed Economy (Pellman et al., 2017), têm sido relacionadas às alterações hormonais associadas às fases do ciclo estral.

As diferenças de sexo encontradas na aprendizagem reversa nesse estudo mostrando um resultado superior dos machos em relação às fêmeas, contrapõem o que é encontrado na literatura (Lucon-Xiccato & Bisazza 2014; Petrazzini et al., 2017), porém uma explicação possível pode ser nas diferentes estratégias de navegação que machos e fêmeas usam no labirinto. Os machos tendem a usar estratégias geométricas, navegando assim com base na forma do ambiente, enquanto as fêmeas tendem a usar estratégias aloclétricas, tanto geométricas quanto baseadas em marcos, navegando assim com base na localização de certos objetos em relação à forma do ambiente (Koss & Frick, 2017). Como não usamos pistas ambientais em nosso aparato, quando o alimento era invertido de lugar, possivelmente as fêmeas se prendiam ao comportamento previamente aprendido por não localizar nenhuma mudança no aparato.

Em uma revisão sistemática sobre alterações comportamentais relacionadas ao TOC que são induzidas por mCPP em roedores (Da Silva et al., em preparação), encontramos vários estudos que, em sua maioria, avaliaram comportamentos defensivos, compulsivos e atividade locomotora em ratos. Esses estudos mostram, de uma maneira geral, que a mCPP produz aumento da ansiedade (Graf et al., 2003; Georgiadou et al., 2012; Reimer et al., 2018), compulsividade (Bhutada et al., 2013; Kreiss et al., 2013; Nardo et al., 2014) e diminuição da

atividade locomotora (Andrés et al., 2002; Yamauchi et al., 2004; Reimer et al., 2018). Raramente são apresentados, entretanto, resultados de experimentos com fêmeas ou que explorem os efeitos da mCPP sobre a flexibilidade comportamental. Sendo assim, no experimento 2 avaliamos os efeitos da mCPP sobre a aprendizagem reversa em machos e fêmeas. Esperava-se que essa habilidade estivesse prejudicada, no atual modelo experimental com ratos *Wistar*, segundo os efeitos da mCPP encontrados na literatura (Eriksson et al., 1999; Boulougouris et al., 2008). Apenas a dose mais alta de mCPP utilizada (2,0 mg/Kg) produziu alterações comportamentais. Nos machos, essa dose de mCPP aumentou o tempo de reação apenas na fase de aprendizagem reversa, sem interferir no aprendizado, pois não modificou os números de acertos ou erros na aprendizagem ou na aprendizagem reversa. Nas fêmeas, a mesma dose de mCPP produziu alterações mais generalizadas, com diminuição do número de acertos, aumento do número de omissões e do tempo de reação na fase de aprendizagem; e diminuição dos acertos, erros e aumento das omissões e tempo de reação na fase de aprendizagem reversa.

Essa alteração no tempo de reação, e no caso das fêmeas consequentemente também no número de omissões, acertos e erros, poderia refletir um déficit motor induzido pela mCPP. De fato, diversos estudos indicam essa redução da atividade locomotora, podendo ser explicada pelo fato de a mCPP produzir uma redução dos receptores 5-HT₂ corticais e uma regulação positiva dos receptores 5-HT₁ no hipocampo, junto com uma diminuição na DA hipotalâmica (Ulrichsen et al., 1992; Andrés et al., 2002; Yamauchi et al., 2004; Reimer et al., 2018). Além disso, foi encontrada uma tolerância funcional à hipoatividade locomotora induzida por mCPP, sem alterações nas respostas neuroendócrinas a mCPP (Ulrichsen et al., 1992; Prisco & Esposito, 1995). A alteração no tempo de reação também poderia ser explicada pelo fato de a mCPP reduzir o apetite (e, portanto, a motivação alimentar). Tal efeito foi observado por Vickers et al. (2003), quando os ratos tratados cronicamente com mCPP reduziram significativamente o peso corporal em relação aos controles. O mesmo resultado foi visto por Carli e Samanin (1992), quando 2,5 mg/Kg de mCPP aumentou o percentual de omissões e a latência para responder corretamente ou para coletar o reforço, sem efeitos nas respostas corretas em uma tarefa de reação em série com cinco opções. Esse aumento do tempo de reação e de omissões pode ser devido a um envolvimento dos receptores 5-HT sobre a motivação dos ratos para buscar alimento. A hipofagia produzida pela mCPP envolve a ativação de receptores 5-HT_{2C} no hipotálamo, onde há maior reserva desse receptor, já a hipolocomoção induzida por mCPP parece ser mediada pela resistência negativa à regulação induzida por agonista dos

receptores 5-HT_{2C} em áreas límbicas como o estriado e o núcleo accumbens (Fone et al., 1998). Por outro lado, a ausência de efeitos da mCPP sobre o tempo de reação durante a fase de aprendizagem nos machos enfraquece essas interpretações, sugerindo um efeito mais específico para aprendizagem reversa nesse caso ou que o potencial efeito motor ou na motivação é fraco o suficiente para não aparecer quando o tempo de reação já se encontra mais alto.

A mCPP tem sido usada desde 1990 como indutor de comportamentos análogos ao TOC em modelos animais (ratos e camundongos), por ser agonista não seletivo 5-HT_{2C}, considerada uma droga ansiogênica que em roedores, evoca os comportamentos repetitivos que envolvem a ativação do córtex orbitofrontal, área cerebral homóloga encontrada como disfuncional em pacientes com TOC (Stark et al., 2006). Em nosso estudo, entretanto, efeitos da mCPP sobre comportamentos análogos ao TOC relacionado à rigidez comportamental podem ter sido mascarados por potenciais efeitos motores e/ou relacionados à hipofagia, principalmente nas fêmeas. Era esperado que os animais tratados com a droga tivessem uma maior dificuldade de se desvincular do comportamento previamente aprendido, ou seja, cometessem mais erros na aprendizagem reversa. Isso não ocorreu. Mas o aumento do tempo de reação específico para a fase de aprendizagem reversa em machos sugere diminuição de flexibilidade comportamental. Outro resultado promissor encontrado foi a diferença marcante do comportamento de omissão nos animais tratados com mCPP, com efeito significativo mais importante nas fêmeas. Faltam, entretanto, dados na literatura para discutir e compreender esse achado, uma vez que esse comportamento é raramente relatado. Possíveis explicações podem envolver a expressão maior de receptores 5-HT_{2C} no encéfalo das fêmeas, incluindo áreas motoras e/ou relacionadas à ansiedade.

6 Conclusões

- O protocolo de Aprendizagem Reversa foi implantado com sucesso utilizando ratos *Wistar* machos e fêmeas em um labirinto em T, sendo necessária privação alimentar prévia de 23 h. Os erros cometidos na Aprendizagem Reversa foram visíveis principalmente no 1º dia.
- O desempenho dos ratos *Wistar* no protocolo experimental apresentou uma diferença de sexos na Aprendizagem Reversa, com melhor desempenho dos machos. Esse resultado é diferente do observado em outras espécies animais e com outros protocolos de aprendizagem.
- Nos machos a mCPP (dose de 2,0 mg/Kg) afetou de forma significativa o tempo de reação apenas na aprendizagem reversa. Nas fêmeas, a mCPP (dose de 2,0 mg/Kg) produziu diminuição do número de acertos, aumento do número de omissões e do tempo de reação na fase de aprendizagem; e diminuição dos acertos, erros e aumento das omissões e tempo de reação na fase de aprendizagem reversa.
- Os efeitos mais pronunciados da mCPP nas fêmeas pode estar relacionado a uma expressão diferencial de receptores 5-HT_{2C} e 5HT₁ entre machos e fêmeas, e/ou com interação com a ação dos esteroides sexuais.
- Os efeitos observados da mCPP podem, além de sugerir diminuição da flexibilidade comportamental, estarem ligados a efeitos da droga sobre a locomoção e diminuição da motivação alimentar dos animais, principalmente nas fêmeas.

7 Referências Bibliográficas

- Abramowitz, J. S., & Jacoby, R. J. (2014). Obsessive-compulsive disorder in the DSM-5. *Clinical Psychology: Science and Practice*, 21(3), 221. <https://doi.org/10.1111/cpsp.12076>
- Adler, S. M., Girotti, M., & Morilak, D. A. (2020). Optogenetically-induced long term depression in the rat orbitofrontal cortex ameliorates stress-induced reversal learning impairment. *Neurobiology of stress*, 13, 100258. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100258>
- Aguirre, C. G., Stolyarova, A., Das, K., Kolli, S., Marty, V., Ray, L., ... & Izquierdo, A. (2020). Sex-dependent effects of chronic intermittent voluntary alcohol consumption on attentional, not motivational, measures during probabilistic learning and reversal. *PloS one*, 15(6), e0234729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234729>
- Alonso, P., López-Solà, C., Real, E., Segalàs, C., & Menchón, J. M. (2015). Animal models of obsessive-compulsive disorder: utility and limitations. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 11, 1939. <https://doi.org/10.2147/NDT.S62785>
- American Psychiatric Association. (2014). *DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. Artmed Editora. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Armbruster, D. J., Ueltzhöffer, K., Basten, U., & Fiebach, C. J. (2012). Prefrontal cortical mechanisms underlying individual differences in cognitive flexibility and stability. *Journal of cognitive neuroscience*, 24(12), 2385-2399. https://doi.org/10.1162/jocn_a_00286
- Andrés, J. I., Alcázar, J., Alonso, J. M., Díaz, A., Fernández, J., Gil, P., ... & Sipido, V. K. (2002). Synthesis and structure-activity relationship of 2-(aminoalkyl)-2, 3, 3a, 8-tetrahydrodibenzo [c, f] isoxazolo [2, 3-a] azepine derivatives: a novel series of 5-HT_{2A/2C} receptor antagonists. Part 1. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(2), 243-248. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00721-1)
- Batistela, M. F., Vilela-Costa, H. H., Frias, A. T., Hernandez, P. M., Lovick, T. A., & Zangrossi Jr, H. (2021). Enhanced responsiveness to hypoxic panicogenic challenge in female rats in late diestrus is suppressed by short-term, low-dose fluoxetine: Involvement of the dorsal raphe nucleus and the dorsal periaqueductal gray. *Journal of Psychopharmacology*, 35(12), 1523-1535. <https://doi.org/10.1177/02698811211058986>
- Benzina, N., N'diaye, K., Pelissolo, A., Mallet, L., & Burguière, E. (2021). A cross-species assessment of behavioral flexibility in compulsive disorders. *Communications Biology*, 4(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01611-y>
- Beucke, J. C., Sepulcre, J., Talukdar, T., Linnman, C., Zschenderlein, K., Endrass, T., ... & Kathmann, N. (2013). Abnormally high degree connectivity of the orbitofrontal cortex in obsessive-compulsive disorder. *JAMA psychiatry*, 70(6), 619-629. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.173>
- Bhutada, P., Dixit, P., Thakur, K., Deshmukh, P., Kaulaskar, S. (2013). Effects of agomelatine in a murine model of obsessive-compulsive disorder: Interaction with meta-

- chlorophenylpiperazine, bicuculline, and diazepam. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(7), 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.11.003>
- Bloch, M. H., McGuire, J., Landeros-Weisenberger, A., Leckman, J. F., & Pittenger, C. (2010). Meta-analysis of the dose-response relationship of SSRI in obsessive-compulsive disorder. *Molecular psychiatry*, 15(8), 850-855. <https://www.nature.com/articles/mp200950>
- Blokland, A. (1998). Reaction time responding in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(6), 847-864. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(98\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(98)00013-X)
- Blokland, A., Rutten, K., & Prickaerts, J. (2006). Analysis of spatial orientation strategies of male and female *Wistar* rats in a Morris water escape task. *Behavioural brain research*, 171(2), 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.033>
- Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *Journal of pharmacy practice*, 27(2), 116-130. <https://doi.org/10.1177/0897190014521996>
- Boulougouris, V., Glennon, J. C., & Robbins, T. W. (2008). Dissociable effects of selective 5-HT 2A and 5-HT 2C receptor antagonists on serial spatial reversal learning in rats. *Neuropsychopharmacology*, 33(8), 2007-2019. <https://www.nature.com/articles/1301584>
- Brigman, J. L., Graybeal, C., & Holmes, A. (2010). Predictably irrational: assaying cognitive inflexibility in mouse models of schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*, 4, 13. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.013.2010>
- Buckley, J. L., & Rasmussen, E. B. (2014). Rimonabant's reductive effects on high densities of food reinforcement, but not palatability, in lean and obese Zucker rats. *Psychopharmacology*, 231(10), 2159-2170. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3366-4>
- Calu, D. J., Stalnaker, T. A., Franz, T. M., Singh, T., Shaham, Y., & Schoenbaum, G. (2007). Withdrawal from cocaine self-administration produces long-lasting deficits in orbitofrontal-dependent reversal learning in rats. *Learning & memory*, 14(5), 325-328. <https://doi.org/10.1101/lm.534807>
- Carli, M., & Samanin, R. (1992). Serotonin 2 receptor agonists and serotonergic anorectic drugs affect rats' performance differently in a five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology*, 106(2), 228-234. <https://doi.org/10.1007/bf02801977>
- Dajani, D. R., & Uddin, L. Q. (2015). Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends in neurosciences*, 38(9), 571-578. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.07.003>
- Da Silva, J.F., Taguchi, L.M., Leite, E.S., & Oliveira, A.R (2022). mCPP-induced behavioral changes as an animal model for OCD: a systematic review. Não Publicado.
- Dalla, C., & Shors, T. J. (2009). Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. *Physiology & behavior*, 97(2), 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.035>
- Deacon, R. M., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*, 1(1), 7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>

- Deibel, S. H., Lehr, A. B., Maloney, C., Ingram, M. L., Lewis, L. M., Chaulk, A. M. P., ... & Thorpe, C. M. (2017). Rats in a levered T-maze task show evidence of time–place discriminations in two different measures. *Learning & behavior*, *45*(2), 184-190. <https://doi.org/10.3758/s13420-016-0254-x>
- Diniz, J. B., Miguel, E. C., Oliveira, A. R. D., Reimer, A. E., Brandão, M. L., Mathis, M. A. D., Batistuzzo, M.C., Costa, D.L.C., & Hoexter, M. Q. (2012). Desenhando as novas fronteiras para a compreensão do transtorno obsessivo-compulsivo: uma revisão de sua relação com o medo e a ansiedade. *Revista brasileira de psiquiatria*, *34*(supl. 1), S81-S103. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462012000500007>
- Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Correa, J. B., Gamaro, G. D., Xavier, M. H., ... & Dalmaz, C. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology & behavior*, *61*(3), 395-398. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00450-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00450-7)
- Eriksson, E., Engberg, G., Bing, O., & Nissbrandt, H. (1999). Effects of mCPP on the extracellular concentrations of serotonin and dopamine in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, *20*(3), 287-296. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00070-0)
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, *76*(6), 1057-1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Fawcett, E. J., Power, H., & Fawcett, J. M. (2020). Women are at greater risk of OCD than men: a meta-analytic review of OCD prevalence worldwide. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *81*(4), 0-0. <https://doi.org/10.4088/jcp.19r13085>
- Floresco, S. B., Block, A. E., & Maric, T. L. (2008). Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behavioural brain research*, *190*(1), 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.008>
- Fone, K. C., Austin, R. H., Topham, I. A., Kennett, G. A., & Punhani, T. (1998). Effect of chronic m-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT_{2C} receptor levels in the rat. *British journal of pharmacology*, *123*(8), 1707-1715. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701798>
- Fontenelle, L. (2001). Aspectos neuropsicológicos do transtorno obsessivo-compulsivo. *Brazilian Journal of Psychiatry*, *23*, 27-30. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462001000600009>
- Galef Jr, B. G. (1995). Why behaviour patterns that animals learn socially are locally adaptive. *Animal behaviour*, *49*(5), 1325-1334. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0164>
- Georgiadou, G., Tarantilis, P. A., & Pitsikas, N. (2012). Effects of the active constituents of *Crocus Sativus* L., crocins, in an animal model of obsessive–compulsive disorder. *Neuroscience letters*, *528*(1), 27-30. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.081>
- Ghahremani, D. G., Monterosso, J., Jentsch, J. D., Bilder, R. M., & Poldrack, R. A. (2009). Neural components underlying behavioral flexibility in human reversal learning. *Cerebral cortex*, *20*(8), 1843-1852. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp247>

- Ghods-Sharifi, S., Haluk, D. M., & Floresco, S. B. (2008). Differential effects of inactivation of the orbitofrontal cortex on strategy set-shifting and reversal learning. *Neurobiology of learning and memory*, 89(4), 567-573. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.007>
- Gouveia Jr, A., dos Santos, U. D., Felisbino, F. E., de Afonseca, T. L., Antunes, G., & Morato, S. (2004). Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behavioural processes*, 67(2), 167-171. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.03.018>
- Gráf, M. (2006). 5-HT_{2c} receptor activation induces grooming behaviour in rats: possible correlations with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacologia Hungarica: a Magyar Pszichofarmakologiai Egyesület Lapja= Official Journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology*, 8(1), 23-28. <https://europepmc.org/article/med/16841562>
- Graf, M., Kantor, S., Anheuer, Z. E., Modos, E. A., & Bagdy, G. (2003). m-CPP-induced self-grooming is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Behavioural brain research*, 142(1-2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00404-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00404-7)
- Granon, S., & Floresco, S. B. (2009). Functional neuroanatomy of flexible behaviors in mice and rats. In S. Granon (Ed.), *Endophenotypes of psychiatric and neurodegenerative disorders in rodent models* (pp. 83-103). Transworld Research Network.
- Gruner, P., & Pittenger, C. (2017). Cognitive inflexibility in obsessive-compulsive disorder. *Neuroscience*, 345, 243-255. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.030>
- Hawley, W. R., Grissom, E. M., Barratt, H. E., Conrad, T. S., & Dohanich, G. P. (2012). The effects of biological sex and gonadal hormones on learning strategy in adult rats. *Physiology & behavior*, 105(4), 1014-1020. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.11.021>
- Hollander, E., DeCaria, C., Gully, R., Nitsescu, A., Suckow, R. F., Gorman, J. M., ... & Liebowitz, M. R. (1991). Effects of chronic fluoxetine treatment on behavioral and neuroendocrine responses to meta-chloro-phenylpiperazine in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry research*, 36(1), 1-17. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(91\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0165-1781(91)90113-4)
- Iachini, T., Sergi, I., Ruggiero, G., & Gnisci, A. (2005). Gender differences in object location memory in a real three-dimensional environment. *Brain and Cognition*, 59(1), 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2005.04.004>
- Izquierdo, A., Brigman, J. L., Radke, A. K., Rudebeck, P. H., & Holmes, A. (2017). The neural basis of reversal learning: an updated perspective. *Neuroscience*, 345, 12-26. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.021>
- Kawaoku, V. M. (2018). Efeitos da meta-clorofenilpiperazina (mCPP) na indução de comportamentos tipo compulsivo em ratos avaliados no teste do campo aberto. Monografia de Graduação em Psicologia (Não Publicada) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- Koss, W. A., & Frick, K. M. (2017). Sex differences in hippocampal function. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 539-562. <https://doi.org/10.1002/jnr.23864>
- Kreiss, D. S., Coffman, C. F., Fiacco, N. R., Granger, J. C., Helton, B. M., Jackson, J. C., ... & Zimmer, B. A. (2013). Ritualistic chewing behavior induced by mCPP in the rat is an

- animal model of obsessive compulsive disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 104, 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.006>
- LaClair, M., Febo, M., Nephew, B., Gervais, N. J., Poirier, G., Workman, K., ... & Lacreuse, A. (2019). Sex differences in cognitive flexibility and resting brain networks in middle-aged marmosets. *Eneuro*, 6(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0154-19.2019>
- Lensi, P., Cassano, G. B., Correddu, G., Ravagli, S., Kunovac, J. L., & Akiskal, H. S. (1996). Obsessive-compulsive disorder. Familial-developmental history, symptomatology, comorbidity and course with special reference to gender-related differences. *The British Journal of Psychiatry*, 169(1), 101-107. <https://doi.org/10.1192/bjp.169.1.101>
- Lucon-Xiccato, T., & Bisazza, A. (2014). Discrimination reversal learning reveals greater female behavioural flexibility in guppies. *Biology Letters*, 10(6), 20140206. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0206>
- Machado Figueiredo, R., de Carvalho, M. C., Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2019). Short-term, low-dose fluoxetine prevents oestrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *Journal of Psychopharmacology*, 33(5), 548-557. <https://doi.org/10.1177/0269881119841833>
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1995). Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, 109(4), 579-593. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.4.579>
- McAlonan, K., & Brown, V. J. (2003). Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behavioural brain research*, 146(1-2), 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.019>
- Menzies, L., Chamberlain, S. R., Laird, A. R., Thelen, S. M., Sahakian, B. J., & Bullmore, E. T. (2008). Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: the orbitofronto-striatal model revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(3), 525-549. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.09.005>
- Milad, M. R., Igoe, S. A., Lebron-Milad, K., & Novales, J. E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience*, 164(3), 887-895. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.011>
- Morrow, J. D., Maren, S., & Robinson, T. E. (2011). Individual variation in the propensity to attribute incentive salience to an appetitive cue predicts the propensity to attribute motivational salience to an aversive cue. *Behavioural brain research*, 220(1), 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.013>
- Morrow, J. D., Saunders, B. T., Maren, S., & Robinson, T. E. (2015). Sign-tracking to an appetitive cue predicts incubation of conditioned fear in rats. *Behavioural brain research*, 276, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.002>
- Nardo, M., Casarotto, P. C., Gomes, F. V., & Guimaraes, F. S. (2014). Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior. *Fundamental & clinical pharmacology*, 28(5), 544-550. <https://doi.org/10.1111/fcp.12051>
- National Research Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals.

- O'Leary, T. P., Gunn, R. K., & Brown, R. E. (2013). What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice?. *Behavior genetics*, *43*(1), 34-50. <https://doi.org/10.1007/s10519-012-9572-8>
- Öst, L. G., Havnen, A., Hansen, B., & Kvale, G. (2015). Cognitive behavioral treatments of obsessive-compulsive disorder. A systematic review and meta-analysis of studies published 1993–2014. *Clinical Psychology Review*, *40*, 156-169. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2015.06.003>
- Pellman, B. A., Schuessler, B. P., Tellakat, M., & Kim, J. J. (2017). Sexually dimorphic risk mitigation strategies in rats. *eneuro*, *4*(1). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0288-16.2017>
- Pentkowski, N. S., Litvin, Y., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2018). Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. *Physiology & behavior*, *194*, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.028>
- Petrazzini, M. E. M., Bisazza, A., Agrillo, C., & Lucon-Xiccato, T. (2017). Sex differences in discrimination reversal learning in the guppy. *Animal cognition*, *20*(6), 1081-1091. <https://doi.org/10.1007/s10071-017-1124-4>
- Pettenuzzo, L. F., Noschang, C., von Pozzer Toigo, E., Fachin, A., Vendite, D., & Dalmaz, C. (2008). Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiology & behavior*, *95*(3), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.06.003>
- Prisco, S., & Esposito, E. (1995). Differential effects of acute and chronic fluoxetine administration on the spontaneous activity of dopaminergic neurones in the ventral tegmental area. *British journal of pharmacology*, *116*(2), 1923-1931. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb16684.x>
- Pujol, J., Soriano-Mas, C., Alonso, P., Cardoner, N., Menchón, J. M., Deus, J., & Vallejo, J. (2004). Mapping structural brain alterations in obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*, *61*(7), 720-730. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.7.720>
- Reimer, A. E., de Oliveira, A. R., Diniz, J. B., Hoexter, M. Q., Chiavegatto, S., & Brandão, M. L. (2015). Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. *Behavioural brain research*, *292*, 370-380. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.036>
- Reimer, A. E., de Oliveira, A. R., Diniz, J. B., Hoexter, M. Q., Miguel, E. C., Milad, M. R., & Brandão, M. L. (2018). Fear extinction in an obsessive-compulsive disorder animal model: Influence of sex and estrous cycle. *Neuropharmacology*, *131*, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.015>
- Rommelink, E., Smit, A. B., Verhage, M., & Loos, M. (2016). Measuring discrimination and reversal learning in mouse models within 4 days and without prior food deprivation. *Learning & Memory*, *23*(11), 660-667. <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.042085>
- Remijnse, P. L., Nielen, M. M., van Balkom, A. J., Cath, D. C., van Oppen, P., Uylings, H. B., & Veltman, D. J. (2006). Reduced orbitofrontal-striatal activity on a reversal learning task in obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*, *63*(11), 1225-1236. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.11.1225>

- Robbins, T. W., Vaghi, M. M., & Banca, P. (2019). Obsessive-compulsive disorder: puzzles and prospects. *Neuron*, *102*(1), 27-47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.046>
- Safari, S., Ahmadi, N., Mohammadkhani, R., Ghahremani, R., Khajvand-Abenedi, M., Shahidi, S., ... & Karimi, S. A. (2021). Sex differences in spatial learning and memory and hippocampal long-term potentiation at perforant pathway-dentate gyrus (PP-DG) synapses in *Wistar* rats. *Behavioral and Brain Functions*, *17*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12993-021-00184-y>
- Saucier, D. M., Shultz, S. R., Keller, A. J., Cook, C. M., & Binsted, G. (2008). Sex differences in object location memory and spatial navigation in Long-Evans rats. *Animal cognition*, *11*(1), 129-137. <https://doi.org/10.1007/s10071-007-0096-1>
- Saxena, S., & Rauch, S. L. (2000). Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric Clinics of North America*, *23*(3), 563-586. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70181-7](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70181-7)
- Shin, D. J., Jung, W. H., He, Y., Wang, J., Shim, G., Byun, M. S., ... & Kwon, J. S. (2014). The effects of pharmacological treatment on functional brain connectome in obsessive-compulsive disorder. *Biological psychiatry*, *75*(8), 606-614. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.002>
- Skapinakis, P., Politis, S., Karampas, A., Petrikis, P., & Mavreas, V. (2019). Prevalence, comorbidity, quality of life and use of services of obsessive-compulsive disorder and subthreshold obsessive-compulsive symptoms in the general adult population of Greece. *International journal of psychiatry in clinical practice*, *23*(3), 215-224. <https://doi.org/10.1080/13651501.2019.1588327>
- Stark, J. A., Davies, K. E., Williams, S. R., & Luckman, S. M. (2006). Functional magnetic resonance imaging and c-Fos mapping in rats following an anorectic dose of m-chlorophenylpiperazine. *Neuroimage*, *31*(3), 1228-1237. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.046>
- Szechtman, H., Sulis, W., & Eilam, D. (1998). Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behavioral neuroscience*, *112*(6), 1475. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.6.1475>
- Szechtman, H., Culver, K., & Eilam, D. (1999). Role of dopamine systems in obsessive-compulsive disorder (OCD): implications from a novel psychostimulant-induced animal model. *Polish Journal of Pharmacology*, *51*(1), 55-61. <https://europepmc.org/article/med/10389145>
- Szechtman, H., Eckert, M. J., Wai, S. T., Boersma, J. T., Bonura, C. A., McClelland, J. Z., ... & Eilam, D. (2001). Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): form and control. *BMC neuroscience*, *2*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-2-4>
- Taguchi, L. M. (2018). Relações entre a autolimpeza induzida por meta-clorofenilpiperazina (mCPP) e os comportamentos de alternância espontânea e checagem compulsiva em ratos. Monografia de Graduação em Psicologia (Não Publicada) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

- Tezcan, D., Tumkaya, S., & Bora, E. (2017). Reversal learning in patients with obsessive-compulsive disorder (OCD) and their unaffected relatives: Is orbitofrontal dysfunction an endophenotype of OCD?. *Psychiatry research*, 252, 231-233. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.03.001>
- Thorsen, A. L., Hagland, P., Radua, J., Mataix-Cols, D., Kvale, G., Hansen, B., & van den Heuvel, O. A. (2018). Emotional processing in obsessive-compulsive disorder: a systematic review and meta-analysis of 25 functional neuroimaging studies. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 3(6), 563-571. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.01.009>
- Tolman, E. C., Ritchie, B. F., & Kalish, D. (1946). Studies in spatial learning. II. Place learning versus response learning. *Journal of experimental psychology*, 36(3), 221. <https://doi.org/10.1037/h0060262>
- Tsaltas, E., Kontis, D., Chrysikakou, S., Giannou, H., Biba, A., Pallidi, S., ... & Rabavilas, A. (2005). Reinforced spatial alternation as an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD): investigation of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1D} receptor involvement in OCD pathophysiology. *Biological Psychiatry*, 57(10), 1176-1185. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.02.020>
- Ulrichsen, J., Partilla, J. S., & Dax, E. M. (1992). Long-term administration of m-chlorophenylpiperazine (mCPP) to rats induces changes in serotonin receptor binding, dopamine levels and locomotor activity without altering prolactin and corticosterone secretion. *Psychopharmacology*, 107(2), 229-235. <https://doi.org/10.1007/BF02245142>
- Van den Heuvel, O. A., Boedhoe, P. S., Bertolin, S., Bruin, W. B., Francks, C., Ivanov, I., ... & Yamada, K. (2020). An overview of the first 5 years of the ENIGMA obsessive-compulsive disorder working group: The power of worldwide collaboration. *Human Brain Mapping*, 43(1), 23-36. <https://doi.org/10.1002/hbm.24972>
- Vickers, S. P., Easton, N., Webster, L. J., Wyatt, A., Bickerdike, M. J., Dourish, C. T., & Kennett, G. A. (2003). Oral administration of the 5-HT_{2C} receptor agonist, mCPP, reduces body weight gain in rats over 28 days as a result of maintained hypophagia. *Psychopharmacology*, 167(3), 274-280. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1378-6>
- Yadin, E., Friedman, E., & Bridger, W. H. (1991). Spontaneous alternation behavior: an animal model for obsessive-compulsive disorder?. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40(2), 311-315. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90559-K](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90559-K)
- Yamauchi, M., Tatebayashi, T., Nagase, K., Kojima, M., & Imanishi, T. (2004). Chronic treatment with fluvoxamine desensitizes 5-HT_{2C} receptor-mediated hypolocomotion in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(4), 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.05.003>
- Zohar, J., Mueller, E. A., Insel, T. R., Zohar-Kadouch, R. C., & Murphy, D. L. (1987). Serotonergic responsivity in obsessive-compulsive disorder: comparison of patients and healthy controls. *Archives of General Psychiatry*, 44(11), 946-951. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800230026006>

Zuluaga, M. J., Agrati, D., Pereira, M., Uriarte, N., Fernandez-Guasti, A., & Ferreira, A. (2005). Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiology & behavior*, *84*(2), 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.12.004>

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSCar

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "IMPLANTAÇÃO DO TESTE REVERSAL LEARNING E UMA POSSÍVEL DIFERENÇA DE RESULTADOS ENTRE SEXOS EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO OBSESSIVO-COMPULSIVO", protocolada sob o CEUA nº 3442130619 (ID 001258), sob a responsabilidade de **Amanda Ribeiro de Oliveira e equipe; Erinete da Silva Leite** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 03/07/2019.

We certify that the proposal "IMPLANTATION OF THE REVERSAL LEARNING TEST AND A POSSIBLE DIFFERENCE OF RESULTS BETWEEN SEX IN AN ANIMAL MODEL OF OBSESSIVE-COMPULSIVE DISORDER", utilizing 144 Heterogenics rats (72 males and 72 females), protocol number CEUA 3442130619 (ID 001258), under the responsibility of **Amanda Ribeiro de Oliveira and team; Erinete da Silva Leite** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/03/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2019](#) a [07/2021](#) Área: [Psicologia](#)

Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Machos	idade:	60 a 90 dias	N:	72
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central da UFSCar	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 90 dias	N:	72
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	200 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) - DPsi

São Carlos, 04 de julho de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos