UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CLARISSA MOREIRA PEREIRA

Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o
consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água
em ratos

São Paulo

2014

CLARISSA MOREIRA PEREIRA

Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o
consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água
em ratos
(Versão Original)

Tese apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Doutor em Psicologia

Área de concentração: Psicologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Paula Debert

São Paulo

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Pereira, Clarissa Moreira.

Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água em ratos / Clarissa Moreira Pereira; orientadora Paula Debert. -- São Paulo, 2015.

85 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Protocolo de estressores 2. Privação de água 3. Peso corporal 4. Ingestão de sacarose 5. Consumo de alimento 6. Ratos I. Título.

HV4915

Nome: Pereira, Clarissa Moreira.

Título: Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água em ratos

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À minha querida mestre, Téia, com
todo o meu carinho e gratidão.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, por todo o apoio durante a minha vida acadêmica, por acreditarem que eu conseguiria, por respeitarem minha ausência nos momentos de trabalho, e por serem a família mais amorosa que alguém poderia ter. Amo e admiro todos vocês.

Ao meu marido, amigo, companheiro e confidente, Mateus. Piu, você me inspira, me ajuda, me guia e me conforta. Ter você ao meu lado me dá orgulho e força para seguir. Te agradeço pela paciência, por cuidar de mim e da nossa casa quando eu não podia fazer nada a não ser escrever e escrever, por me acompanhar várias vezes na coleta, e por ser a pessoa incrível que você é. Amo você. Meu muito obrigada!

Aos amigos feitos durante o doutorado, e que foram excelentes confidentes, amigos para rir e chorar, “tomar uma” para relaxar, e que levo daqui para a vida: Rafa, Helô, Dani, Ene, Liane e Fe. Vocês fizeram toda a diferença!

Aos colegas de coleta, meu muito obrigada pelo companheirismo nessa árdua tarefa que é fazer coleta de dados com sujeitos infra-humanos.

Ao Celso, querido colega de laboratório, que mais do que um bioterista foi um verdadeiro “resolvedor de problemas” durante a coleta. Obrigada!

Aos professores do doutorado na USP, e aos professores do meu início de doutorado na PUC, obrigada pelos ensinamentos.

À Paula Debert, minha orientadora, obrigada pelas discussões e correções.

Ao CNPq, agradeço pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Pereira, C. M. (2014). Efeito do protocolo de estressores e da privação de água sobre o consumo de sacarose, o peso corporal e o consumo de alimento e água em ratos. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O Chronic Mild Stress (CMS) é um modelo animal de depressão estudado para investigação das causas e dos “atenuadores” deste problema. Nele, ratos são submetidos a um protocolo de estressores moderadamente aversivos de maneira crônica. É observada diminuição na ingestão e preferência por substância líquida doce por conta desta submissão. Em estudo sobre o papel da privação de alimento e água no conjunto de estressores, Pereira e Sérió (2010) não observaram os efeitos de diminuição na ingestão e preferência por sacarose. É levantada a possibilidade de que a privação de água e alimento a que os sujeitos foram submetidos previamente ao protocolo poderia ter sido responsável pelas diferenças encontradas, já que diferiu em muitos aspectos do realizado por Willner et al. (1987). O objetivo do presente estudo foi o de investigar o papel da privação de água no protocolo de estressores. Três grupos de sujeitos foram propostos: Grupo Protocolo (submetido ao protocolo completo), Grupo Privação (submetido apenas à privação de água presente no protocolo) e Grupo Controle (submetido apenas aos testes semanais de ingestão e preferência). Foram realizados testes de ingestão e preferência por sacarose antes, durante e depois do protocolo ou da privação e aferições semanais de peso e consumo de alimento e água. Como resultado o consumo de sacarose apresentou queda com o decorrer dos testes tanto para os Grupos Protocolo e Privação quanto para o Grupo Controle. Ou seja, não é possível atribuir a nenhum dos procedimentos (protocolo ou privação) a queda observada nessa medida. O peso corporal apresentou queda também para os três grupos assim que iniciado o procedimento de privação precedente ao teste. Apenas quando iniciados o protocolo e a privação para os grupos correspondentes, ocorreu menor ganho de peso semanal nesses grupos em comparação ao Grupo Controle. Com relação ao consumo de alimento, observou-se queda para os três grupos quando iniciada a privação semanal. Iniciado o protocolo de estressores, o consumo de alimento para o Grupo Protocolo apresentou a menor queda dentre os três, comparativamente ao que consumia antes. É sugerido que o consumo de sacarose não é uma boa medida dos efeitos do protocolo, sendo discutidas possibilidades de maior controle sobre essa medida e sugeridas outras medidas como possivelmente mais precisas para aferir os efeitos do protocolo.

Palavras-chave: protocolo de estressores, privação de água, peso corporal, ingestão de sacarose, consumo de alimento, ratos.

ABSTRACT

Pereira, C. M. (2013). Effects of a stress protocol and water deprivation on sucrose consumption, body weight and food and water intake by rats. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chronic Mild Stress (CMS) is an animal model of depression studied by different areas of research into the causes and "attenuators" of this problem. In it, rats are subjected to a protocol of moderately aversive stressors applied chronically. Decreased intake and preference for sweet liquid substance on behalf of that submission is observed. In a study on the role of the deprivation of food and water in the set of stressors, Pereira and Sérgio (2010) did not observe the effects of decreased intake and preference for sucrose. It is raised the possibility that the deprivation of food and water that the subjects were submitted previously to the protocol might have been responsible for the differences found, given it differed in many aspects to what was done by Willner et al. (1987). The aim of the present study was to investigate the role of water deprivation in the stress protocol. Three groups of subjects were proposed: Protocol (submitted to the full protocol), Deprivation (subject only to the deprivation of water present in the protocol) and Control (subject only to the weekly consumption and preference tests). Free tests of sucrose intake and preference before, during and after the protocol or the deprivation were carried out. The main results observed were that for both the Protocol and Deprivation Groups and for the Control Group, sucrose consumption decreased over the course of the tests. That means it is not possible to assign to any of the procedures (protocol or deprivation) the decreased consumption observed. Body weight decreased in the three groups as soon as the deprivation procedure preceding the test started, but when the protocol and deprivation for the corresponding groups began, lower weekly weight gain occurred in these groups compared to the control group. With respect to food intake, a decrease for the three groups when initiated weekly deprivation was observed. As the stress protocol began, food intake in this group had the smallest drop compared to that consumed before in relation to the other groups. It is suggested therefore that the sucrose consumption is not a good measure of the effects of the protocol, and possibilities of control over this measure are discussed, along with the suggestion of other more precise measures of the effects of the stress protocol.

Key-words: stress protocol, water deprivation, body weight, sucrose ingestion, food intake, rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ciclo de sete dias de apresentação dos estressores. Na coluna de horas, o período de escuro é indicado pela cor cinza, e o período de claro pela cor branca (com exceção dos períodos de iluminação contínua durante a noite ou iluminação intermitente, conforme descrito)	39
Tabela 2 -	Ciclo de sete dias de apresentação apenas do estressor “privação de água”. Na coluna das horas, o período de escuro é indicado pela cor cinza, e o período de claro pela cor branca	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do tempo das condições experimentais a que os sujeitos foram submetidos	42
Figura 2 -	Valores médios de ingestão de sacarose e água por grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) nos testes de ingestão e preferência realizados semanalmente durante a Linha de Base 1, 2 e 3 (LB1, LB2 e LB3), a exposição ao protocolo de estressores ou à privação por seis semanas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e aos testes após protocolo ou privação 1, 2 e 3 (AP1, AP2 e AP3)	43
Figura 3 -	Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Controle em cada teste realizado durante todo o experimento	45
Figura 4 -	Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Protocolo em cada teste realizado durante todo o experimento. As duas interrupções na continuidade das linhas significam, respectivamente, o início e o fim do protocolo de estressores	47
Figura 5 -	Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Privação em cada teste realizado durante todo o experimento. As duas interrupções na continuidade das linhas significam, respectivamente, o início e o fim do procedimento de privação de água correspondente à privação do protocolo de estressores	50
Figura 6 -	Peso médio semanal de cada grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) antes do início dos testes (Semanas -7 a 0) e a partir do início dos testes (LB1) até o final do experimento	52
Figura 7 -	Peso semanal individual para cada grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) a partir da Semana 0 até o final do experimento	55

Figura 8 -	Porcentagem média de variação de peso semanal por grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a semana precedente ao início dos testes de ingestão e preferência (Semana 0). Os valores acima da linha horizontal representam ganho de peso com relação ao peso inicial. Os valores abaixo da linha, perda de peso com relação ao peso inicial (em percentual)	57
Figura 9 -	Porcentagem de variação de peso semanal por indivíduo em cada grupo (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a semana precedente ao início dos testes de ingestão e preferência (Semana 0)	60
Figura 10 -	Ingestão de sacarose (ordenada esquerda) e peso corporal (ordenada direita) médios de cada grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) em cada teste realizado durante todo o experimento	62
Figura 11 -	Consumo semanal médio de água (painel superior) e comida (painel inferior) por grupo (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) desde antes início dos testes de ingestão e preferência (valor anterior à Semana 0) até a última semana do experimento (AP3)	65
Figura 12 -	Média de variação de consumo de água (painel superior) e comida (painel inferior) semanal por grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a média do consumo nas três semanas de linha de base (Semanas LB1, LB2 e LB3)	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
MÉTODO	34
Sujeitos	34
Equipamento	35
Procedimento	35
Grupo Protocolo de Estressores	38
Grupo Privação de Água	40
Grupo Controle	40
RESULTADOS	43
1. Ingestão e preferência por sacarose	43
2. Peso corporal	51
2.1. Relação entre peso e ingestão de sacarose	61
2.2. Relação entre peso e consumo de alimento e água	63
DISCUSSÃO	70
REFERÊNCIAS	81

Modelos animais são caracterizados pela busca por compreensão acerca de determinada psicopatologia humana (sua etiologia comportamental e biológica) e pelo desenvolvimento de novos e mais eficazes tratamentos para ela (Dias, 2009; Matthews, Christmas, Swan, & Sorrell, 2005; Willner, 1991).

Para que um modelo seja considerado válido, ele precisa contemplar os critérios de validade aparente, de constructo (ou etiológica), e farmacológica. A validade aparente diz respeito ao fato de que o efeito produzido no modelo animal deve ser semelhante ao encontrado em seres humanos que apresentem o transtorno. A validade de constructo (ou etiológica) refere-se ao fato de que a etiologia do problema apresentado pelos animais no modelo deve ser semelhante ao que ocorre fora do laboratório, ou seja, os fatores causais na psicopatologia e no modelo animal devem ser comuns. A validade farmacológica, por sua vez, requer que os efeitos produzidos nos animais sejam revertidos pelos mesmos medicamentos que revertem os sintomas em pacientes tratados com tais medicamentos (e.g. Krishnan & Nestler, 2011; Willner, 1997).

Um modelo animal de depressão conhecido e amplamente estudado e discutido é o *Chronic Mild Stress* (CMS), originalmente descrito por Willner, Towell, Sampson, Sophokleous e Muscat (1987). Neste modelo, ratos são submetidos por um determinado período de tempo a um protocolo de estressores moderadamente aversivos¹. Após essa exposição, é observada uma diminuição na ingestão de substâncias líquidas doces (sacarose ou sacarina diluídas em água), e/ ou na preferência pela substância doce com relação à água pura, sendo esta revertida pela aplicação crônica de antidepressivos. Essa diminuição na ingestão e/ ou na preferência é interpretada como indicativo de uma das características frequentemente presentes no transtorno depressivo maior, a “acentuada diminuição do interesse ou prazer” (DSM-V, 2014, p. 8, Transtornos Depressivos I), atestando a validade aparente do modelo, e a reversão desse efeito pelo medicamento atestaria sua validade farmacológica.

Em estudo conduzido pelos autores (Willner et al., 1987 – Experimento 2), pretendeu-

¹ Argumenta-se que os estímulos que compõem o protocolo seriam moderadamente aversivos por não produzirem os efeitos mencionados (diminuição na ingestão e preferência por sacarose) quando aplicados isoladamente ou em episódios únicos (Muscat & Willner, 1992). Porém, em sua revisão dos estudos realizados utilizando-se o protocolo, Willner (2005) coloca que “com exceção de um projeto anterior que sugere que estressores proximais aplicados na gaiola viveiro (e.g. agrupamento, privação de alimento) foram mais potentes em eliciar mudanças comportamentais do que estressores distais (e.g. barulho, mudança do ciclo claro-escuro) (Muscat & Willner), não há estudos publicados sobre os efeitos de variações paramétricas de diferentes elementos do pacote do CMS” (p. 103). Uma análise mais pormenorizada dos efeitos isolados de alguns dos estressores será realizada ao longo do trabalho na medida em que o presente trabalho pretende investigar alguns desses efeitos.

se investigar a produção de diminuição na ingestão e preferência por sacarose pelo protocolo de estressores e a possibilidade de reversão deste efeito por um antidepressivo. Foram utilizados ratos machos da linhagem *Lister Hooded* divididos em dois grupos, Protocolo (submetido ao protocolo e aos testes) e Controle (não submetido ao protocolo, apenas aos testes), e o protocolo de estressores foi composto dos seguintes estímulos: (a) privação de água (quatro períodos semanais de 23, 20, 17 e 26 horas) e comida (três períodos semanais de 23, 43 e 26 horas); (b) iluminação contínua (duas noites por semana em que luz permanece acesa, alterando o ciclo claro-escuro); (c) inclinação da gaiola em 30° (dois períodos semanais: sete e 17 horas); (d) agrupamento na gaiola (outro sujeito) (um período semanal de 17 horas); (e) gaiola suja (um período semanal de sete horas); (f) exposição à temperatura reduzida (10° C) (dois períodos semanais de 30 minutos); (g) ruído branco intermitente (dois períodos semanais de três e cinco horas); (h) luz estroboscópica (dois períodos semanais de duas e sete horas); (i) exposição a uma garrafa vazia após período de privação de água (um período semanal de uma hora); (j) acesso restrito à comida após privação de alimento (pequenos pedaços de ração disponibilizados na caixa); (l) cheiro novo (um período semanal de 17 horas); (m) presença de um objeto estranho na caixa (madeira ou plástico) (um período semanal de 17 horas). Os estressores eram apresentados de maneira alternada em um ciclo de sete dias, sendo este ciclo repetido por seis semanas consecutivas. Uma das medidas dos efeitos do protocolo foi a ingestão e preferência por sacarose líquida (dissolvida em água em concentração de 1%) com relação à água pura, cada uma disponibilizada em uma de duas garrafas simultaneamente acopladas na gaiola viveiro por uma hora semanalmente. A posição em que garrafas eram disponibilizadas era alternada a cada semana. Antes do teste, os sujeitos eram privados de água e alimento por 23 horas. Esse procedimento de privação ocorreu para todos os sujeitos (mesmo para os sujeitos do Grupo Controle, que nunca passaram por nenhum dos demais estressores) durante todo o experimento previamente à realização de todos os testes. Além do teste realizado uma vez antes do protocolo, para distribuição dos sujeitos pelos grupos de acordo com a quantidade ingerida², foram realizados testes semanalmente durante o protocolo para sujeitos de ambos os grupos (Controle e Protocolo). A partir da terceira semana de exposição ao protocolo, foi também administrado um medicamento antidepressivo tricíclico (DMI) à metade dos sujeitos de cada grupo e placebo à

² Os autores não descrevem como a subdivisão dos grupos foi realizada a partir das quantidades consumidas por cada sujeito, apenas dissertam que os sujeitos foram “combinados a partir do consumo de sacarose” (p. 359). Supõe-se que os grupos foram formados equalizando-se a “quantidade” de sacarose consumida previamente ao protocolo em cada um deles, ou seja, alguns sujeitos que consumiram mais e alguns sujeitos que consumiram menos foram colocados em cada grupo, aproximando o valor médio de ingestão de ambos.

outra metade para investigação dos efeitos deste medicamento na ingestão e preferência.

Como resultados, foi encontrada diminuição significativa na ingestão e preferência por sacarose para o Grupo Protocolo durante as três primeiras semanas de protocolo, tanto com relação à medida de linha de base (os valores médios durante o protocolo chegaram à metade do consumido anteriormente a ele), quanto comparativamente ao Grupo Controle, que teve aumento na ingestão de sacarose durante o mesmo período (os valores médios para o Grupo Protocolo caíram para menos da metade do valor médio de consumo do Grupo Controle, ao final do protocolo). Para os sujeitos do Grupo Protocolo que tiveram o antidepressivo administrado, os valores da ingestão de sacarose retornaram ao previamente apresentado logo na segunda semana de administração do medicamento, o que não ocorreu para os sujeitos desse grupo que tiveram administração de placebo. Para os sujeitos Controle, não foi encontrado efeito do antidepressivo (o medicamento não alterou o consumo de sacarose para esses sujeitos). Willner et al. (1987) concluíram que o protocolo de estressores produziu diminuição de ingestão de sacarose pelos sujeitos, comparativamente ao Grupo Controle, sendo esta revertida pela administração de DMI.

A partir do estudo de Willner et al. (1987), diversos experimentos foram conduzidos utilizando-se protocolos de estressores semelhantes ao original³ e produzindo os mesmos efeitos reportados no estudo de 1987. Foram realizados estudos com diferentes medidas, como o uso do condicionamento de preferência por lugar para investigação da sensibilidade à recompensa (Papp, Willner, Muscat & Street, 1991), comportamento agressivo e sexual (D'Aquila, Brain & Willner, 1994), padrão de sono (Cheeta, Ruigt, van Proosdij, & Willner, 1997), entre outros. Além disso, os efeitos do protocolo foram replicados com outras espécies, como, por exemplo, camundongos (Monleon, D'Aquila, Parra, Simon, Brain, & Willner, 1995). Estudos demonstraram que os efeitos do protocolo de diminuição no consumo e preferência por sacarose foram minimizados e/ ou revertidos pela submissão a uma condição operante em ratos, em que a resposta de pressão à barra mantida em diferentes esquemas de reforçamento intermitente por diferentes reforçadores (água, sacarose, alimento, acesso à roda de atividades) “atenuou” esse efeito em comparação com sujeitos controle (Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009). Foram realizados também estudos investigando o papel da dopamina na depressão (e.g. Cheeta, Broekkamp & Willner, 1994;

³ Os protocolos (quantidade e qualidade dos estressores, além de diferença em sua distribuição e tempo de duração ao longo da semana) mudam de um estudo para o outro sem que haja justificativa para tal. No entanto, o fato de que todos produzem efeitos semelhantes faz com que Willner (2005) defenda a validade dos estudos e do protocolo com suas modificações.

Muscat, Papp & Willner, 1992; Muscat, Sampson & Willner, 1990; Muscat, Towell & Willner, 1988; Sampson, Willner & Muscat, 1991), diversos testes de medicamentos antidepressivos, como amitriptilina (Sampson, Willner & Muscat, 1991), fluoxetina e maprotilina (Muscat, Papp & Willner, 1992), mianserin (Cheeta, Broekkamp & Willner, 1994), pramipexole (Willner, Lappas, Cheeta & Muscat, 1994), brofaromina e buspirona (Papp, Moryl & Willner, 1996), além de testes com medicamentos não antidepressivos, como atropina, mepiramina – com efeitos positivos –, e d-Anfetamina, haloperidol, clorprotixeno e morfina – sem efeitos (Papp, Moryl & Willner, 1996). Willner (2005) afirma que dados todos os estudos e resultados reportados, a relação entre o protocolo e seus efeitos demonstra consistência, bem como a reversão desses diversos efeitos pelos medicamentos antidepressivos, o que atestaria a validade do CMS como modelo animal da depressão.

Mesmo tendo sido conduzida esta grande variedade de estudos com resultados semelhantes em diferentes espécies e laboratórios (Willner, Moreau, Nielsen, Papp & Sluzewska, 1996), o modelo CMS recebeu diversas críticas (e.g. Broekkamp, 1997; Weiss, 1997). Uma dessas críticas (Reid, Forbes, Stewart & Matthews, 1997) envolveu questionamento sobre os efeitos do protocolo serem atribuíveis a um estressor específico ou ao conjunto de estressores aplicados de maneira conjunta, alternada e crônica. Ou seja, o aspecto questionado não seria com relação à validade aparente, já que o protocolo (aquele conjunto de estímulos aplicados de determinada maneira) produz um efeito (a redução na ingestão e preferência por sacarose, interpretada como anedonia). Tampouco quanto à validade farmacológica, já que o efeito é revertido pelo antidepressivo. O questionamento seria, portanto, com relação à validade de constructo (ou etiológica): atribui-se o efeito a todas aquelas variáveis ambientais e argumenta-se, portanto, que a depressão humana e a anedonia no modelo animal teriam semelhança com relação aos fatores causais de ambas. No entanto, se apenas um dos estressores do protocolo fosse responsável pelo efeito, esse critério precisaria ser revisto. Mais do que isso, cada estressor precisaria ser avaliado com relação tanto às suas características físicas (suas propriedades) quanto com relação a maneira de aplicação do mesmo (imprevisível ou não, crônica ou aguda, etc.), para se demonstrar que aspecto é crítico (necessário) e/ ou suficiente para a produção daqueles efeitos. Conhecidos tais aspectos, seria possível afirmar (ou não) a respeito da homologia com a etiologia da depressão.

Muscat e Willner (1992) realizaram um estudo composto de nove experimentos, em que diversos parâmetros do protocolo de estressores foram manipulados, com a finalidade de investigar o papel de alguns dos estressores nos efeitos reportados como atribuíveis ao

protocolo como um todo. Foram investigados, sempre na ingestão de sacarose (e não na preferência, sendo os testes realizados apenas com uma garrafa contendo sacarose), os efeitos de seis semanas de submissão ao protocolo de estressores⁴ (Experimento 1); os efeitos de um regime de restrição alimentar constante em comparação ao protocolo de estressores por seis semanas e a diferença entre os grupos quando o teste é realizado após período de privação de alimento e água ou sem que nenhuma privação desses itens preceda o teste (Experimento 2); o papel do alojamento individual ou em duplas prévio e durante um protocolo de três semanas (Experimento 3) ou de quatro semanas (Experimento 4); o efeito do agrupamento, um dos estressores, realizando-se um protocolo de seis semanas sem a presença desse (Experimento 5); o efeito da aplicação dos estressores apenas no período noturno por um período de 2 semanas (Experimento 6); o efeito da iluminação contínua, um dos estressores, aplicada isoladamente durante quatro semanas (Experimento 7); os efeitos de dois subconjuntos de estressores sendo aplicados apenas no período da noite, um deles com estressores classificados como proximais – agrupamento, gaiola suja e inclinação da gaiola – e o outro, com estressores classificados como distais – iluminação contínua, ruído intermitente e luz estroboscópica, por um período de três semanas (Experimento 8); o efeito dos elementos do protocolo proximal aplicados isoladamente por diferentes períodos e o possível efeito de habituação aos estímulos (a) na exposição repetida a um mesmo estressor e (b) na exposição a uma variedade de estressores (Experimento 9).

Dentre todas as manipulações realizadas, por ser foco do presente estudo, será aqui destacado com mais detalhes o Experimento 2. Ou seja, assim como no presente estudo, o papel da privação no Experimento 2 (ainda que no estudo de Muscat & Willner, 1992, seja a privação de alimento, e no presente estudo a privação de água) foi investigado isoladamente em comparação ao protocolo de estressores completo. Nesse experimento, objetivou-se

⁴ A partir daqui, as diferenças nos protocolos em cada estudo relatado serão descritas, dado que o presente estudo propõe justamente uma análise de um dos estressores do protocolo (a privação de água), e a modificação nos estressores utilizados em diversos estudos na área aumenta a importância de se descrever detalhadamente cada protocolo utilizado. No estudo de Muscat e Willner (1992) o protocolo de estressores diferiu do utilizado no estudo de 1987 nos seguintes aspectos: duração e frequência dos períodos semanais de privação de água e alimento e luz estroboscópica; ausência, no estudo de Muscat e Willner, dos estressores temperatura reduzida, objeto estranho na gaiola, cheiro e exposição à garrafa vazia após privação de água. O protocolo de estressores do estudo de 1992 foi composto de dois períodos de 20 horas de privação de alimento e água, um imediatamente antes do teste de ingestão de sacarose e o outro seguido de duas horas de acesso restrito à alimento (algumas pelotas de 45 mg colocadas na caixa); mais um período de privação de água de 16 horas; dois períodos de iluminação contínua (luz acesa à noite); dois períodos (sete e 17 horas) de inclinação da gaiola a 45°; um período de 17 horas de agrupamento; um período de 17 horas de gaiola suja (100 ml de água é jogada na serragem da gaiola); dois períodos (três e cinco horas) de ruído branco intermitente (85 dB); três períodos (sete, nove e 17 horas) de luz estroboscópica (300 flashes/ minuto).

avaliar o consumo de sacarose durante a submissão ao protocolo em comparação a esse consumo dado um regime de privação de alimento em que os sujeitos tinham acesso à comida por uma hora diariamente. Água foi mantida disponível para esses sujeitos durante todo o experimento (exceto no período anterior ao teste, conforme será descrito). Portanto, não foi avaliado, nesse estudo, o efeito da privação de água isoladamente, apenas da privação de alimento. Foram utilizados ratos machos da linhagem *Lister Hooded*. Três grupos compuseram o experimento: Grupo Controle (apenas passaram pelos testes semanais de ingestão de sacarose), Grupo Protocolo (submetido ao protocolo de estressores e aos testes semanais de ingestão de sacarose), Grupo Privação (submetido a um regime de privação de alimento de apenas uma hora de acesso diário à comida e aos testes semanais de ingestão de sacarose). O protocolo e o regime de privação tiveram a duração de seis semanas. Todos os testes foram realizados com apenas uma garrafa contendo sacarose a 1%, disponibilizada por uma hora, sempre após 20 horas de privação de alimento e água, para todos os grupos (inclusive Grupo Controle). Anteriormente ao início do protocolo ou do regime de privação, todos os sujeitos passaram por três testes de linha de base. Após o início do protocolo ou da privação, os testes continuaram a ocorrer semanalmente durante seis semanas, de maneira idêntica, com exceção do Teste 5, em que nenhuma privação precedeu o teste. Esse procedimento foi realizado para investigar se a privação precedente ao teste poderia ser responsável por um aumento “artificial” na ingestão apresentada pelo Grupo Controle, produzindo, dessa forma, uma discrepância entre os dois grupos erroneamente atribuída ao protocolo como um todo. Além disso, no Teste 4, foi realizada a medida do consumo de alimento uma hora e três horas após o fim do teste. Essa medida foi realizada com objetivo de investigar se o consumo de alimento, e não apenas o consumo de sacarose, seria afetado pelo protocolo de estressores e/ ou pelo regime de privação. O sexto teste foi idêntico aos três primeiros, possibilitando a investigação da manutenção dos efeitos do protocolo ao longo da exposição.

São apresentados no estudo os resultados do Teste 4, em que os autores relatam ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos, tendo o Grupo Protocolo apresentado consumo médio de sacarose de aproximadamente 7 g, enquanto que os Grupos Controle e Privação apresentaram consumo médio aproximado de 10 g. Esse resultado indicaria, segundo os autores, que mais uma vez foi demonstrada a relação entre a submissão ao protocolo de estressores e a redução no consumo de sacarose por sujeitos submetidos ao protocolo, já que o consumo é menor para esses sujeitos em comparação aos demais grupos. Mais ainda, que a privação de alimento, da maneira como foi aplicada aos sujeitos do Grupo Privação, não foi

suficiente para produzir o mesmo efeito, já que o consumo de sacarose para esse grupo ficou próximo ao apresentado pelo Grupo Controle. No Teste 5, em que nenhuma privação precedeu a exposição à sacarose, foi encontrada a mesma diferença entre os grupos, ou seja, o Grupo Protocolo consumiu menos que os Grupo Controle e Privação. É apontado, porém, que a diferença ocorreu em menor magnitude, pelo fato do consumo absoluto ser menor (variou entre 4 e 6 g nos grupos). Muscat e Willner (1992) afirmam então que a privação precedente ao teste, da maneira como realizaram (20 horas de privação de alimento e de água), não poderia ser apontada como responsável pela diferença entre os grupos (por, por exemplo, aumentar o consumo do Grupo Controle), já que a diferença se mantém quando nenhuma privação precede o teste. No entanto, ressalta-se aqui que o fato de se isolar essa variável em apenas um teste não é suficiente para se afirmar sobre seu papel na ingestão apresentada pelos grupos ao longo das semanas de realização do experimento.

Na medida de alimento ingerido após o Teste 4, o consumo dos Grupos Protocolo e Controle foi próximo (aproximadamente 8 g e 7 g, respectivamente), ambos inferiores ao consumo do Grupo Privação (aproximadamente 11 g). Ou seja, aparentemente, o protocolo completo afeta em menor medida o consumo de alimento do que a privação de alimento constante, conforme aplicada aos sujeitos desse grupo (apenas uma hora de acesso ao alimento por dia). No entanto, os autores não ressaltam essa diferença, mas sim que o consumo do Grupo Protocolo foi maior que o do Grupo Controle (mesmo tendo sido pequena a diferença), e colocam esse dado como indicativo de que o protocolo afeta o valor reforçador do alimento, uma vez que estudos com condicionamento de local associam o aumento no consumo de alimento à diminuição em seu valor reforçador. Esse argumento apresenta pelo menos três problemas. Em primeiro lugar, a diferença entre os Grupos Protocolo e Controle é muito pequena, mais ainda quando comparados esses grupos com o Grupo Privação; portanto, se o efeito foi notado para o Grupo Protocolo, provavelmente ele ocorreu também para o Grupo Controle, não sendo possível, desta forma, atribuir o efeito ao protocolo de estressores. Em segundo lugar, a lógica de que o aumento no consumo indica diminuição no valor reforçador do alimento é contrária à lógica apresentada para a redução no consumo de sacarose, já que os mesmos autores falam que a redução no consumo de sacarose é indicativa de “anedonia”, que seria a diminuição na sensibilidade àquele item. Em terceiro lugar, se o aumento no consumo de alimento estivesse associado a uma diminuição em seu valor reforçador, os autores precisariam discutir o maior consumo apresentado pelo Grupo Privação também nesses termos, o que não ocorre. A única discussão apresentada com relação a esse grupo refere-se ao fato de que o consumo de sacarose para ele foi semelhante ao do Grupo

Controle, atestando que a queda no peso corporal devida à privação não seria responsável pelas diferenças entre sujeitos submetidos ao protocolo completo e sujeitos não submetidos a ele.

Com relação aos demais experimentos do estudo que manipularam diversos aspectos do protocolo (conforme colocado anteriormente), vale ressaltar que as diferentes manipulações permitiram, entre outras, algumas conclusões⁵: (a) a condição de alojamento individual produziu maior efeito do protocolo com relação a alojamento em conjunto, considerando-se a ingestão de sacarose no teste na primeira semana de exposição ao protocolo, porém indiferença nos testes após duas e três semanas; (b) a aplicação dos estressores no período da noite também produziu redução na ingestão de sacarose, mesmo que de forma menos expressiva do que o protocolo diurno o fez; (c) apenas a iluminação contínua não foi capaz de produzir os mesmos efeitos que o conjunto completo de estressores, sendo a ingestão de sacarose nessa condição comparável à do Grupo Controle; o mesmo ocorreu para o protocolo distal (iluminação contínua, barulho branco e luz estroboscópica); (d) o protocolo proximal (agrupamento, gaiola suja e inclinação), no entanto, foi capaz de produzir redução na ingestão nas semanas um e três de sua aplicação; (e) a remoção do agrupamento como um estressor não afetou os efeitos do protocolo; no entanto, apenas esse estressor produziu isoladamente o efeito de diminuição na ingestão de sacarose, e maior demora para habituação do que os demais estressores proximais aplicados isoladamente. Para os autores, essas conclusões atestariam, mais uma vez, a validade do modelo.

Pelo fato da privação de alimento ter sido realizada de maneira diferente de como ela é aplicada no protocolo (Experimento 2), ou seja, acesso de uma hora por dia ao alimento e não períodos de privação de alimento intermitente, não tendo sido isolada do protocolo como foi feito com outros estressores (Experimentos 8 e 9), e o mesmo ocorrendo com a privação de água, o papel desses estressores no protocolo, após a análise metodológica realizada no estudo de Muscat e Willner (1992), permaneceu indeterminado.

Isso permitiu o questionamento colocado por Matthews, Forbes e Reid (1995). Os autores afirmaram que a redução da ingestão de sacarose não consistiria em um efeito produzido pelo protocolo, mas apenas pelas privações de alimento e água presentes nele. Segundo eles, as privações de água e alimento (que fazem parte do protocolo) produziram a redução do peso, o que faria com que os animais ingerissem menor quantidade de sacarose, já

⁵ São apenas citados os dados obtidos pelas manipulações realizadas pelos autores no estudo de 1992 para ilustrar os parâmetros do protocolo que foram manipulados pelos autores. Por não ser de interesse na presente pesquisa, apenas o estudo que isolou a privação de alimento (Experimento 2) foi pormenorizadamente descrito.

que tal ingestão é proporcional ao peso dos sujeitos. Para avaliar essa hipótese, Matthews et al. propuseram a replicação do estudo de Willner et al. (1987) em um estudo no qual o objetivo era investigar a possível relação entre o peso corporal e o consumo de sacarose. Assim como no estudo de Willner et al., foram utilizados ratos machos da linhagem *Lister Hooded* e propostos dois grupos, um submetido ao protocolo de estressores semelhante⁶ ao deles (Grupo Protocolo) e outro não submetido ao protocolo (Grupo Controle), sendo para ambos realizados os testes de ingestão e preferência e a medida do peso corporal. Os testes eram realizados de maneira semelhante a Willner et al., disponibilizando-se duas garrafas por uma hora semanalmente, uma contendo água e outra sacarose a uma concentração de 0,9%. Previamente aos testes, os sujeitos eram privados de alimento e água por 21 horas. A cada semana, o lado de apresentação de cada líquido era alternado. Diferente do estudo de Willner et al., Matthews et al. analisaram a medida do consumo de sacarose de cada sujeito em relação ao peso do respectivo sujeito. Esta análise foi realizada calculando-se a quantidade de sacarose consumida (em gramas) dividida pelo peso dos sujeitos (em gramas). Isto foi feito para que, conforme proposto, pudesse ser avaliada a possível diminuição do consumo ser proporcional à diminuição no peso dos sujeitos.

Como resultados os autores encontraram que, com relação ao peso, a média dos grupos, inicialmente muito próxima (286 g para o Grupo Protocolo e 293 g para o Grupo Controle), passou a diferir significativamente após o início do protocolo para um dos grupos. O ganho de peso foi mantido para o Grupo Controle, enquanto não houve ganho de peso durante este período para o Grupo Protocolo (diferença de aproximadamente 80 g em média ao final das oito semanas de protocolo). Esse resultado indicaria que há efeito do protocolo no ganho de peso dos sujeitos. Com relação ao consumo de sacarose, os sujeitos do Grupo Protocolo apresentaram menor consumo de sacarose que os sujeitos do Grupo Controle (aproximadamente 20% menos, em média). No entanto, quando calculado o consumo de sacarose com relação ao peso corporal dos sujeitos, não foi encontrada diferença entre os grupos. Pelo fato das medidas relativas de peso corporal e consumo não diferirem entre os Grupos Controle e Protocolo, os autores defendem que, não o protocolo como um todo, mas

⁶ Com relação ao protocolo, vale ressaltar que foram utilizados os mesmos estressores em ambos os estudos, com exceção da redução de temperatura e do objeto estranho na gaiola, não utilizados por Matthews et al. (1995). A diferença entre eles consistiu no número de horas semanais de aplicação de alguns estressores, e no número total de semanas de exposição ao protocolo. Em Willner et al. (1987), a privação de água foi aplicada em 88 horas semanais, alimento 91 horas, inclinação 24 horas e luz estroboscópica nove horas, e o protocolo durou seis semanas, enquanto em Matthews et al. a privação de água foi de 79 horas, alimento 67 horas, inclinação 27 horas e luz estroboscópica 14 horas semanais, e o protocolo durou 11 semanas.

apenas a privação (que seria o estressor responsável pela perda de peso), é que produz a redução na ingestão de sacarose⁷. Uma manipulação crítica, segundo colocam Matthews et al., seria a implementação apenas do regime de privação presente no protocolo em um grupo de sujeitos, e o protocolo completo em outro grupo, para se investigar a possível relação entre perda de peso e consumo de sacarose. O que os autores propuseram, portanto, diferiu do que havia sido realizado por Muscat e Willner (1992) em alguns aspectos: (1) a privação realizada no estudo de Muscat e Willner foi apenas de alimento; (2) essa privação foi realizada segundo um regime de restrição diária por tempo (uma hora de acesso ao alimento por dia), e não da mesma forma que é realizada ao longo do protocolo (3 períodos semanais, um de 23, um de 43 e um de 26 horas); (3) Muscat e Willner contaram apenas com um grupo privado de alimento para fazer sua comparação, e nenhum sujeito ou grupo foi submetido a nenhum tipo de privação de água. Dessa forma, essa proposta de investigação permanecia em aberto.

Então, conforme proposto por Matthews et al. (1995), Forbes, Stewart, Matthews e Reid (1996) realizaram um estudo em que isolaram a privação do protocolo para avaliar seu papel. Foram utilizados no estudo ratos machos da linhagem *Lister hooded*, e o estudo foi composto de um grupo controle (Grupo Controle), um grupo submetido ao protocolo completo de estressores⁸ (Grupo Protocolo Completo), um grupo submetido apenas às privações de água e alimento do protocolo (Grupo Privação), e um quarto grupo submetido apenas ao restante dos estressores do protocolo, com exceção das privações de água e alimento (Grupo Protocolo Modificado). Seu argumento, similar ao de Matthews et al., era o de que mesmo que os sujeitos submetidos ao protocolo ganhem peso mais lentamente que os sujeitos não submetidos a ele, o consumo de sacarose por grama de peso corporal é o mesmo para os dois grupos, se feito o cálculo relativo. Portanto, pelo fato da privação alimentar reduzir o peso dos sujeitos, e ela estar presente no protocolo, a hipótese colocada pelos autores seria a de que a privação isoladamente, e não o conjunto de estressores, seria responsável pela redução no consumo de sacarose observada para esses sujeitos. Segundo os

⁷ Os autores não falam no peso do sujeito interferir também no consumo de água, salientando apenas a relação entre o peso e o consumo de sacarose. No entanto, ao serem analisados os dados apresentados no estudo (são apresentados consumo absoluto de sacarose e porcentagem de preferência), fica aparente haver também essa relação: há redução no consumo absoluto de sacarose, mas não na preferência por ela. Esse dado só poderia ser obtido se ocorresse queda proporcional no consumo de água ao que ocorre com o consumo de sacarose. Dessa forma, infere-se que os autores defendam que o consumo de qualquer um dos itens é relativo (proporcional) ao peso corporal, não apenas o de sacarose.

⁸ O protocolo utilizado foi semelhante ao de Matthews et al. (1995), diferindo com relação ao número de horas semanais de inclinação da gaiola e de privação de água (duas horas a mais e uma hora a menos, respectivamente, no estudo de Forbes et al., 1996), e pelo fato de no estudo de Forbes et al. haver sido implementada a exposição a uma garrafa de água vazia por uma hora após privação de água e presença de objeto estranho na gaiola por sete horas semanais. Assim como no estudo de Willner et al. (1997), o protocolo teve duração de seis semanas.

autores, essa investigação não foi possível no estudo de Muscat e Willner (1992), pelo fato de que a restrição alimentar conforme realizada por eles reduziu o peso mais do que o que é reduzido no protocolo, o que impossibilitou a comparação entre os grupos. Os testes de consumo e preferência foram realizados de maneira idêntica ao estudo de Matthews et al.

Como resultados, o peso corporal médio dos Grupos Controle e Protocolo Modificado (sem privações alimentar e hídrica) não apresentou diferenças significativas entre si, enquanto ambos apresentaram peso maior que os demais grupos (entre 250 g e 400 g em média ao longo do experimento para os Grupos Controle e Protocolo Modificado, e entre 250 g e 300 gramas para os Grupos Privação e Protocolo Completo). Os últimos, por sua vez, também não diferiram entre si, ou seja, tanto o grupo apenas privado de alimento e água quanto o Grupo Protocolo Completo apresentaram a mesma redução de peso. Isso indicaria que a redução de peso geralmente observada quando os sujeitos são submetidos ao protocolo de estressores é devida a, especificamente, as privações de água e alimento presentes no protocolo, e não aos demais estressores que o compõem.

Com relação ao consumo de sacarose, não foi encontrada diferença significativa entre os Grupos Controle e Protocolo Modificado, mas sim entre eles e os Grupos Privação e Protocolo Completo. Tanto o Grupo Privação quanto o Grupo Protocolo Completo consumiram significativamente menos que os demais grupos. A inspeção da figura mostrada no estudo permite inferir uma diferença entre 20 e 30% a menos no consumo de sacarose para os Grupos Privação e Protocolo Completo em comparação aos Grupos Controle e Protocolo Modificado, a partir da segunda semana de submissão a esses procedimentos, sendo o menor consumo entre todos os grupos observado no Grupo Protocolo. Esse resultado indica que, conforme hipótese levantada por Matthews et al. (1995), o consumo de sacarose observado variou conforme o peso corporal. Ou seja, para os grupos em que o menor peso foi observado (Grupos Protocolo Completo e Privação), também os menores valores de consumo de sacarose foram encontrados. A preferência por sacarose com relação à água não apresentou diferença significativa entre nenhum dos quatro grupos, mantendo-se entre 70 e 90% aproximadamente para todos ao longo de todo o experimento.

Com esses resultados os autores concluíram que as privações de alimento e água são não somente necessárias, mas suficientes para produzir os resultados reportados em estudos com o protocolo de estressores completo. Segundo discutem, isso poderia se dar por consequências metabólicas dos elementos privação de água e privação de alimento presentes no protocolo, no entanto não detalham que alterações seriam essas. Outra possibilidade colocada é a de que a massa corporal reduzida produz um consumo reduzido do líquido, já

que o consumo seria proporcional ao tamanho do sujeito, como já apontado por Matthews et al. (1995). Dessa forma, é colocado novamente nesse estudo que os testes de consumo e preferência não seriam boas medidas do estado hedônico dos sujeitos submetidos ao protocolo, dado que um elemento isolado do mesmo produz alterações semelhantes às do protocolo completo. Os autores ressaltam que esse resultado não atesta que o protocolo completo não tenha o efeito de diminuição na sensibilidade à recompensa, conforme os estudos anteriores apontam, mas que a medida utilizada é problemática.

Vale aqui ressaltar um aspecto com relação ao consumo relativo ao peso corporal se manter inalterado para ambos os estudos, Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996). Willner, Moreau, Nielsen, Papp e Sluzewska (1996), quando comparam os resultados dos estudos realizados por seu grupo (e.g. Muscar & Willner, 1992) com os de Matthews et al. (e poder-se-ia supor as mesmas colocações também para o estudo de Forbes et al., dada a mesma racional apresentada e os resultados encontrados nesse estudo), colocam que enquanto os sujeitos de seus estudos perdem no máximo 10,2% de seu peso corporal após três semanas de submissão ao protocolo de estressores, no estudo de Matthews et al. essa perda chega a ser superior a 20% dado o mesmo período. Ou seja, a perda de peso é muito superior para esses estudos do que o encontrado por Willner et al. Dessa forma, a proporção entre consumo de sacarose e peso se manteria inalterada, dada a grande queda em ambos, o que não ocorre nos estudos do grupo de Willner. É ainda necessário que se replique, portanto, o procedimento utilizado por Matthews et al. e Forbes et al., para se investigar a possibilidade de que alguma variável manipulada nesses estudos pudesse estar produzindo uma maior queda no peso (relativamente aos demais estudos com o protocolo), o que ocasionou a razão entre peso e consumo se manter inalterada durante o experimento e na comparação entre os Grupos Protocolo e Controle.

Hatcher, Bell, Reed e Hagan (1997), levando em consideração que apenas as privações do protocolo poderiam ser responsáveis pelas alterações no consumo de sacarose observadas nos estudos com o modelo (conforme Matthews et al., 1995 e Forbes et al., 1996), realizaram um estudo em que sujeitos foram submetidos ao protocolo de estressores⁹ e o consumo de

⁹ O protocolo utilizado foi baseado no estudo de Moreau, Jenck, Martin, Mortas e Haefely (1992), e os autores não justificam a escolha de tal protocolo. O protocolo utilizado por Hatcher et al. (1997) consistiu de agrupamento em gaiola suja (ou seja, ambos os estressores eram aplicados concomitantemente, diferente do que fora feito nos estudos relatados até aqui), por 17 horas semanais; agrupamento por 17 horas semanais; confinamento por sete períodos de uma hora semanais; privação de água e alimento por 35 horas semanais cada, aplicadas concomitantemente; acesso restrito a alimento por uma hora semanal, após privação de alimento; ruído branco por seis horas semanais; cheiro estranho por 13 horas semanais. O tempo de exposição ao protocolo variou entre quatro e oito semanas, a depender do experimento.

sacarina foi utilizado como medida¹⁰ para mais uma vez investigar o papel das privações de alimento e água no protocolo. Foram utilizados ratos machos da linhagem *PVG* e o estudo foi composto de quatro experimentos. Em todos os experimentos, os testes de ingestão e preferência foram realizados disponibilizando-se duas garrafas, uma contendo água e outra sacarina a 0,1%, por 18 horas (iniciando-se às 16 horas de um dia e finalizando às 9 horas do dia seguinte), e o alimento permanecia presente na gaiola viveiro durante toda a sua realização. A posição de apresentação das garrafas era alternada a cada teste. Os autores não descrevem nenhum procedimento de privação empregado antes do teste, portanto supõe-se que não havia privação para sua realização. Todos os sujeitos eram pesados semanalmente, para acompanhamento e investigação da relação entre o consumo de sacarina e o peso corporal.

Diversas manipulações foram realizadas com a finalidade de investigar o papel das privações de alimento e água do protocolo e o efeito do isolamento (alojamento de sujeitos em grupos ou individualmente) no consumo de sacarina. Por ser de interesse especial do presente estudo, serão descritas em mais detalhes as manipulações que envolveram as privações.

Os grupos que compuseram o estudo foram os seguintes: (1) Grupo Protocolo (submetidos ao protocolo de estressores por quatro, cinco ou oito semanas). No caso do grupo submetido ao protocolo por oito semanas, foi alterada a distância entre a privação de alimento e o teste na Semana 5 (visto que, pelo protocolo de estressores, a privação ocorria na noite de segunda para terça-feira, e o teste na noite de terça para quarta-feira, e nessa semana o teste ocorreu na noite de quarta para quinta-feira). Também para esses sujeitos não foi realizada a privação de alimento na noite de segunda para terça-feira na Semana 7 (ou seja, a privação de alimento prevista no protocolo que ocorre previamente ao teste foi suprimida nessa semana); (2) Grupo Protocolo sem Privação de Água (submetidos aos demais estressores do protocolo, exceto a privação de água, por quatro semanas); (3) Grupo Protocolo sem Privação de Alimento (submetidos aos demais estressores do protocolo, exceto a privação de alimento, por quatro ou sete semanas); (4) Grupo Privação de Alimento (submetidos apenas a dois períodos de privação de alimento semanais, por duas ou quatro semanas). Nessa condição, o grupo exposto a quatro semanas de privação de alimento foi exposto aos períodos correspondentes à privação de alimento do protocolo (ou seja, foi exposto à privação de alimento idêntica à do

¹⁰ Os autores não justificam a escolha da sacarina ao invés da sacarose para a realização da medida de consumo e preferência do estudo.

protocolo, e não aos demais estressores). O grupo exposto a duas semanas de privação de alimento foi formado metade por sujeitos que passaram antes disso pelo protocolo completo por cinco semanas e metade por sujeitos controle (e não é especificado se, para esse grupo, a privação de alimento era idêntica ou não à do protocolo). No primeiro caso, foram realizados testes com uma garrafa de água e outra de sacarina; no segundo, os testes foram realizados com duas garrafas de água, sendo também medido o consumo de alimento durante o período de teste; (5) Grupo Controle (submetidos apenas aos testes aos quais os demais grupos experimentais de comparação estavam sendo submetidos).

Como principais resultados, o Grupo Protocolo (1) apresentou menor ingestão de sacarina em comparação a sujeitos controle (tanto isolados quanto agrupados), nas quatro semanas de teste (consumo aproximadamente 40% menor). Para o Grupo Protocolo exposto a oito semanas que passou pelas manipulações nas Semanas 5 e 7 (em que o teste foi atrasado em 24 horas para ficar mais distante do último período de privação de alimento precedente e em que a privação de alimento precedente ao teste foi suprimida, respectivamente), o consumo de sacarina foi maior nessas semanas que nas Semanas 4, 6 e 8¹¹, e semelhante ao do Grupo Controle.

Para o Grupo Protocolo sem Privação de Água (2), a mesma queda no consumo de sacarina observada para o Grupo Protocolo ocorreu, ou seja, a supressão da privação de água do protocolo de estressores não teve nenhum efeito na ingestão de sacarina observada nos testes. No entanto, para sujeitos em que a privação de alimento foi suprimida do protocolo (Grupo 3 – Protocolo sem Privação de Alimento), a ingestão de sacarina apresentou os maiores níveis, tanto em comparação aos demais grupos submetidos ao protocolo (completo ou sem privação de água), em que foi mais que o dobro nas quatro semanas de teste, quanto em comparação aos sujeitos controle, em que ficou aproximadamente 30% maior também a partir da segunda semana de testes. Ou seja, a privação de alimento se mostrou crítica no protocolo de estressores para a produção de redução no consumo de sacarina.

Dentre os grupos que passaram pela privação de alimento (4), o menor consumo de água foi encontrado para os sujeitos que haviam passado antes pelo protocolo com relação aos sujeitos que não passaram. Ou seja, aparentemente, o protocolo de estressores produz também efeito de redução no consumo absoluto de água após sua suspensão (ou seja, o efeito parece ser duradouro). Com relação ao consumo de alimento, não foi encontrada diferença entre os grupos.

¹¹ Os dados das Semanas 1 a 3 não são mostrados no estudo.

Com relação ao peso, o Grupo Controle apresentou maior peso que os grupos submetidos ao protocolo (completo ou sem as privações de alimento ou água), ganhando entre 35 e 40 g durante o experimento, contra 4 a 13 g dos demais grupos. No entanto, mesmo sem nenhuma privação de alimento, o Grupo Protocolo sem Privação de Alimento apresentou ganho semelhante aos grupos que passaram por essa privação: aproximadamente 10 g. Portanto, não apenas a privação de alimento, mas os demais estressores do protocolo parecem ser responsáveis pelo menor ganho de peso observado durante esse período para sujeitos submetidos a eles.

Analisando os dados de consumo de sacarina relativo ao peso corporal, os autores não encontraram efeito diferente do que encontraram na análise do consumo absoluto. Mesmo caindo o peso para o Grupo Protocolo, o consumo relativo ao peso ainda foi menor para esse grupo em comparação ao Grupo Controle. Ou seja, mesmo com o menor consumo e menor peso, a comparação da medida relativa ainda não fica semelhante. Isso ocorre porque, conforme salientado por Willner et al. (1996), a queda no consumo em termos absolutos é muito superior à queda no peso, e para que o consumo relativo ao peso fosse semelhante, o peso deveria apresentar proporcionalmente a mesma diferença entre os grupos apresentada pelo consumo, o que não ocorre. Portanto, também no estudo de Hatcher et al. (1997), o peso não apresentou uma queda expressiva o suficiente para que a razão entre o consumo de sacarose e o peso se mantivesse constante e semelhante entre os grupos, o que mais uma vez coloca a questão sobre qual variável teria sido responsável por tamanha queda no peso, conforme observado em Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996).

Os autores concluem que assim como reportado pela literatura da área, o protocolo de estressores produziu redução no consumo de sacarina, em comparação a grupos controle não submetidos a ele. Quando a privação de água é suprimida do protocolo, não há diferença nos efeitos do mesmo em comparação ao protocolo completo, ou seja, a privação de água não se mostrou necessária para ocasionar redução no consumo de sacarina. No entanto, quando a privação de alimento é suprimida do protocolo, o mesmo efeito não é encontrado. Mais do que isso, quando apenas a privação de alimento é aplicada aos sujeitos sem que nenhum outro estressor esteja presente, a diminuição na ingestão de sacarina ocorre. Ou seja, não somente a privação de alimento se mostrou necessária, como suficiente para a diminuição no consumo de sacarina. Maior evidência ainda do papel da privação de alimento foi encontrada quando apenas um dos períodos semanais do protocolo (o que precede o teste) foi suprimido e a redução no consumo de sacarina não ocorreu, assim como quando foi aumentado o intervalo entre o último período de privação e o teste. Portanto, a privação de alimento, segundo os

resultados, não somente deve estar presente, como deve ser próxima (anteceder em pouco tempo) do teste para que ocorra o efeito. Ainda, segundo os autores, a redução no consumo de sacarina reflete uma redução geral no consumo de líquidos, já que o consumo de água também apresentou redução, quando realizado esse teste (Grupo Privação de Alimento). Além disso, também a redução no consumo de água depende da presença da privação de alimento, uma vez que só ocorreu nos grupos em que ela estava presente.

Quanto ao peso, o menor ganho encontrado em sujeitos submetidos ao protocolo com relação ao controle mais uma vez corrobora os dados reportados na literatura (e.g., Matthews et al., 1995; Muscat & Willner, 1992). Porém, não há confirmação nesse estudo de que quando calculado o consumo de sacarina relativo ao peso seria eliminada a diferença entre sujeitos submetidos ao protocolo e sujeitos não submetidos a ele, conforme hipótese colocada por Matthews et al. e Forbes et al. (1996). Os autores discutem que esse resultado pode dever-se tanto ao fato de haver maior queda em termos absolutos no consumo que no peso, conforme já discutido, quanto ao fato de que o estudo apresenta diversas diferenças metodológicas com relação aos estudos citados (os testes duram 18 horas, e não uma hora; o protocolo é composto de estressores não utilizados em nenhum dos demais estudos, como confinamento; etc.). Ainda assim, os autores ressaltam que mais uma vez foi encontrada evidência de que a medida de consumo de substância doce é altamente dependente do status alimentar dos ratos, o que levanta questionamentos a respeito da hipótese colocada por Willner et al. (1987) de que esta seria uma medida de anedonia.

Em resumo, os estudos anteriormente relatados questionavam a relação entre peso corporal e consumo de sacarose ou sacarina, e propuseram manipulações para investigar tal relação. Mais ainda, questionavam o papel de determinado estressor (a privação – tanto de alimento quanto de água) no conjunto dos estressores com relação à produção do efeito de diminuição no consumo de substâncias doces. No estudo de Matthews et al. (1995), fora apenas realizado o cálculo de consumo relativo ao peso e inferida a relação entre a privação e o consumo de sacarose, permanecendo a necessidade de tal manipulação para a identificação dessa relação. Essa manipulação foi então realizada por Forbes et al. (1996), em que isolaram-se as privações do protocolo. Porém, conforme salientado por Willner et al. (1996), a relação de covariação entre peso e consumo só se mostrou verdadeira porque a queda no peso, nesses estudos, foi muito superior que nos demais estudos da área. Em Hatcher et al. (1997), em que mais uma vez o papel da privação no protocolo foi investigado, não foi demonstrada a razão entre consumo e peso, porém foi demonstrado o papel crítico da privação de alimento no protocolo. No entanto, pelo fato do protocolo apresentar muitas diferenças com relação ao de

Willner et al. (1987), Matthews et al. e Forbes et al., da substância usada ter sido outra, e dos testes terem duração de muitas horas (18 horas, ao invés de uma hora, como nos demais estudos), permanecia ainda a dúvida sobre o papel da privação naquele protocolo e sobre o consumo de sacarose aferido em um teste semanal de uma hora.

Pereira e Sérgio (2010), então, propuseram um estudo também com objetivo de investigar o papel isolado da privação de alimento e água na produção de diminuição de ingestão e preferência por sacarose, medida em um teste semanal de uma hora de duração, utilizando um protocolo semelhante ao de Willner et al. (1987), e sua possível relação com um atenuante dos efeitos do protocolo, sessões operantes em esquema concorrente¹². Portanto, seu estudo se assemelhou a uma replicação de Forbes et al. (1996), diferindo pela inclusão da medida operante.

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* e propostos os seguintes grupos de sujeitos: Grupo A – Protocolo Completo, ou seja, protocolo com todos os estressores, semelhante ao de Willner et al. (1987)¹³, inclusive as privações de alimento e água; Grupo B – Protocolo Incompleto, ou seja, protocolo com todos os estressores, exceto as privações de alimento e água; Grupo C – Apenas Privação, ou seja, apenas o estressor privação de alimento e o estressor privação de água, apresentados da mesma maneira que no protocolo. Em todos os grupos, parte dos sujeitos passou também pelas sessões operantes¹⁴. Para possibilitar o acompanhamento preciso da evolução do peso dos sujeitos e, assim, ter informações necessárias para fazer a análise conduzida por Matthews et al. (1995), Forbes et al. (1996) e Hatcher et al. (1997), foi iniciada a pesagem dos ratos entre o segundo e quinto dias de vida. Pelo fato dos sujeitos serem alojados em grupo e com a mãe até o desmame, foi necessário marcar cada sujeito em uma parte do corpo com tinta violeta genciana para que fossem identificados no momento da pesagem. Os sujeitos eram alojados na mão da experimentadora e posicionados para que fosse feita a marcação. Entre a manipulação, marcação e pesagem dos sujeitos, eram decorridos aproximadamente dois minutos por sujeito, o que totalizava

¹² Estudos anteriores do mesmo laboratório (Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009) investigaram a interação entre o protocolo e a resposta operante de pressão à barra, e por esse motivo o estudo de Pereira e Sérgio (2010) se propôs a mais uma vez investigar essa relação. Foram encontrados nesses estudos resultados que permitiram levantar a hipótese de que a submissão às sessões operantes atenuaria os efeitos do protocolo de estressores de diminuição na ingestão e preferência por sacarose, visto que sujeitos submetidos a essa condição apresentavam menor redução e recuperação mais rápida da ingestão e preferência.

¹³ Apenas o estressor temperatura reduzida não foi aplicado, pela dificuldade de sua aplicação no laboratório, e por ter sido também suprimido dos estudos de Thomaz (2001, 2009), Dolabela (2004), Rodrigues (2005) e Cardoso (2008) sem aparente prejuízo aos efeitos do protocolo.

¹⁴ Nas sessões operantes, foi mantido o esquema de reforçamento (concorrente FR) utilizado por Thomaz (2001, 2009), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005), porém em menor razão do que nos anteriores.

aproximadamente 20 minutos por caixa (tempo esse em que a mãe permanecia alojada em outra caixa, ou seja, os sujeitos permaneciam separados da mãe). Esse procedimento, portanto, representou uma diferença entre o estudo de Pereira e Sérgio e os demais estudos aqui descritos.

Para realizar sessões operantes e testes de ingestão e preferência antes do protocolo sem submeter os sujeitos a períodos demasiadamente longos de privação (por esta ser a variável investigada no experimento), Pereira e Sérgio (2010) propuseram apenas dois períodos de privação de alimento e água semanais, de 23 e 26 horas (um precedendo os testes e o outro as sessões operantes). Nesse aspecto, seu estudo diferiu dos demais estudos do mesmo laboratório que também realizaram sessões operantes, nos quais os sujeitos permaneciam sob regime de privação de água constante, para manutenção do peso em 85% do peso *ad lib*. Isto ocorreu para todos os sujeitos, com exceção dos sujeitos do Grupo Protocolo Incompleto (sem privação), que passaram pelos procedimentos de teste e sessão operante sem nenhuma privação precedente. Os testes eram realizados disponibilizando-se, na gaiola viveiro dos sujeitos, uma garrafa contendo água e outra sacarose a 2%, por uma hora, comparando-se a quantidade restante ao final com a quantidade disponibilizada para medir o consumo de cada um dos líquidos. Foram realizados 12 testes antes do protocolo, acompanhando as 12 semanas de sessões operantes precedentes ao protocolo. Nesse aspecto, também, seu estudo diferiu estudos aqui relatados (por exemplo, Willner et al., 1987 e Matthews et al., 1995, que realizaram apenas um teste antes do protocolo, e Muscat & Willner, 1992, que realizou três testes antes), em que os sujeitos passaram por um menor número de testes previamente ao protocolo.

Nessa ordem, portanto, os sujeitos passaram pelas seguintes condições: (1) do nascimento ao desmame (30 dias de vida), marcação e pesagem diárias (manipulação); (2) do desmame ao início da privação (90 dias de vida, aproximadamente), pesagem diária e alimento e água livremente disponíveis; (3) aos 90 dias de vida, início das sessões operantes e testes de consumo e preferência semanais (após os períodos de privação de alimento e água, para os sujeitos dos grupos que passavam por privações), por 12 semanas; (4) após as 12 semanas, início do protocolo de estressores e continuação das sessões operantes e testes, por seis semanas; (5) após as seis semanas, suspensão do protocolo e continuação das sessões operantes e testes, por três semanas.

Como resultados, todos os sujeitos que passaram pelas três diferentes condições, protocolo completo, protocolo incompleto e apenas privação, não apresentaram diminuição na ingestão e preferência por sacarose em nenhum momento do experimento. Contrariamente,

houve aumento na ingestão média ou manutenção dos valores de consumo durante todo o experimento para todos os sujeitos, inclusive durante o protocolo de estressores. Para os sujeitos do Grupo A (protocolo completo), as médias de consumo de sacarose antes, durante e depois do protocolo foram, respectivamente, 18,89 ml, 27,36 ml e 25,11 ml. Para os sujeitos do Grupo B (protocolo incompleto), 8,74 ml, 11,97 ml e 12,88 ml. Finalmente, para os sujeitos do Grupo C (apenas privação), as médias foram de 19,02 ml, 22,67 ml e 21,22 ml. Mesmo os sujeitos que não passaram por sessões operantes não apresentaram a diminuição reportada por Willner et al. (1987) ou pelos estudos anteriores do mesmo laboratório (Cardoso, 2008; Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005; Thomaz, 2001, 2009).

O procedimento de privação empregado por Pereira e Sérgio (2010) e o número de testes de ingestão e preferência previamente ao protocolo diferiu enormemente do que fora realizado, por exemplo, com os sujeitos do estudo de Willner et al. (1987), Matthews et al. (1995) ou de Thomaz (2001). Em Pereira e Sérgio, os sujeitos passaram por dois períodos de privação semanais e testes de ingestão e preferência, também semanais, por 12 semanas antes de ser iniciado o protocolo. No estudo de Willner et al. e de Matthews et al., apenas um período de privação de 23 e 21 horas, respectivamente para cada estudo, e um teste de ingestão e preferência foi realizados antes do protocolo. No estudo de Thomaz, a privação de água foi constante durante todo o experimento, sendo realizada a privação de alimento anteriormente aos testes e nos períodos em que estava prevista como estressor durante o protocolo. Por apresentar tamanha diferença exatamente com relação à variável que se propunha a investigar (a saber, a privação de alimento e de água), portanto, não há como comparar os resultados de Pereira e Sérgio aos de Willner et al., Matthews et al., Forbes et al. (1996), Hatcher et al. (1997) ou Thomaz, assim como não há possibilidade em se afirmar que não existe fundamento no argumento de Matthews et al., Forbes et al. e Hatcher et al. a respeito da relação entre privação e redução no consumo de sacarose. Desta forma, se mostra ainda necessária a investigação do papel da privação no protocolo de estressores.

Outra possibilidade para explicar os resultados negativos de Pereira e Sérgio (2010) seria a linhagem utilizada no estudo. Em estudo realizado por D'Aquila, Newton e Willner (1997), os autores relatam que a mudança para essa linhagem (*Wistar*) em seu laboratório ocasionou resultados menos consistentes utilizando o modelo CMS, ou seja, em alguns estudos havia o efeito de redução na ingestão de sacarose para ratos submetidos ao protocolo, em outros não. Nos estudos em que o resultado era positivo, os autores observaram que o teste de ingestão e preferência havia sido realizado no início do período de escuro dos sujeitos, e não durante o período de claro. Portanto, nesse estudo, foi proposta a comparação dos efeitos

do protocolo¹⁵ em testes realizados nos diferentes períodos.

Foram utilizados no estudo ratos machos da linhagem *Wistar*. Inicialmente, todos os sujeitos passaram por um período de adaptação à sacarose a 2%, em que a água foi removida da gaiola viveiro e substituída pela sacarose por 48 horas. Após a adaptação, iniciou-se a realização dos testes de ingestão e preferência. Todos os testes tiveram duração de uma hora, com privação de alimento e água por 23 horas precedente ao início do teste. Metade dos sujeitos passou pelos testes no período de claro (das 10 às 11 horas), e metade no período de escuro (das 18 às 19 horas). Além da alternância da posição inicial de apresentação das garrafas a cada semana, durante um mesmo teste, transcorridos 30 minutos duas novas garrafas eram colocadas no lugar das anteriores, em posição inversa com relação ao líquido. Ou seja, se a primeira garrafa de sacarose estava na esquerda e a primeira de água na direita, quando feita a substituição pelo segundo par de garrafas a sacarose era colocada na direita e a água na esquerda. Os autores não dizem quantos testes foram realizados em linha de base, nem se eles ocorreram semanalmente ou em sequência, apenas relatam que a partir do consumo no último teste de linha de base, os sujeitos foram então divididos em Grupos Protocolo e Controle, dado o consumo apresentado, para equalizar o consumo médio entre os grupos. Portanto, o estudo foi composto de quatro grupos de sujeitos, Grupo Protocolo teste no claro, Grupo Protocolo teste no escuro, Grupo Controle teste no claro e Grupo Controle teste no escuro. O protocolo de estressores durou seis semanas, e os testes continuaram a ser realizados semanalmente durante esse período (para metade dos sujeitos durante o período de claro, para a outra metade, durante o período de escuro). A pesagem dos sujeitos ocorreu no início do período de estressores e logo após seu término, e o ganho de peso semanal foi estimado a partir desses dados.

Não houve nenhum efeito significativo do protocolo de estressores no consumo de água nos testes. Além disso, ao comparar o consumo de sacarose da primeira metade do teste

¹⁵ O protocolo utilizado foi diferente de Willner et al. (1987) tanto com relação à qualidade dos estressores (foram utilizados confinamento, luz estroboscópica no escuro e iluminação intermitente, diferente de 1987; não foram utilizados os estressores objeto estranho na gaiola, redução de temperatura, presença de garrafa vazia após período de privação de água, acesso restrito a alimento, barulho branco intermitente e cheiro estranho), quanto com relação aos momentos de apresentação e períodos de duração. Os estressores foram apresentados na seguinte sequência e duração: de terça-feira às 19 horas até quarta-feira às 10 horas, agrupamento (15 horas); de quarta-feira das 10 às 18 horas, luz estroboscópica no escuro (8 horas); de quarta-feira às 18 horas até quinta-feira às 10 horas, privação de alimento em gaiola suja (16 horas); de quinta-feira das 10 às 18 horas, inclinação da gaiola em 45° (8 horas); de quinta-feira às 18 horas até sexta-feira às 10 horas, confinamento em gaiola de camundongo (16 horas); de sexta-feiras das 10 às 18 horas, agrupamento (8 horas); de sexta-feira às 18 horas até sábado às 10 horas, privação de água (16 horas); de sábado das 10 às 18 horas, luz estroboscópica no escuro (8 horas); de sábado para domingo, iluminação contínua; domingo das 6 às 18 horas, iluminação intermitente (luz apaga e acende a cada 2 horas) (12 horas); de segunda-feira, início da privação de alimento e água de 23 horas às 11 horas (para os sujeitos testados no claro) ou às 19 horas (para sujeitos testados no escuro).

(primeiros 30 minutos) com a segunda metade, percebe-se que cerca de 80% do consumo ocorreu na primeira metade. Dessa forma, os autores relatam não analisar os dados da segunda metade, apenas dos primeiros 30 minutos de teste. Com relação aos sujeitos testados no claro, não são encontradas diferenças significativas entre sujeitos do Grupo Protocolo e do Grupo Controle, nem efeito de diminuição no consumo para sujeitos do Grupo Protocolo. Pela inspeção gráfica dos dados, parece haver, para os dois grupos, ligeiro aumento no consumo até a Semana 3, e pequena queda a partir de então. Para os sujeitos testados no escuro, o maior consumo é apresentado pelo Grupo Controle, enquanto o consumo do Grupo Protocolo diminui ao longo das semanas. Nas Semanas 4 a 6, a diferença entre os grupos é significativa, e parece ser de aproximadamente 30% maior para o Grupo Controle. O mesmo ocorre com a preferência. Isso indica que, portanto, o momento do teste interfere no resultado dos efeitos do protocolo para ratos da linhagem *Wistar*. Esse dado indicaria que os resultados negativos com ratos dessa linhagem poderiam ser devidos aos testes diurnos, e a mudança para testes noturnos faria com que o efeito de redução no consumo de sacarose fosse novamente encontrado. Mais ainda, reforçaria, segundo os autores, o CMS como modelo animal da melancolia, já que o pior humor para pacientes que apresentam o quadro ocorre de manhã, e sendo observado o contrário com os ratos, que são uma espécie noturna, atestaria ainda maior semelhança entre o modelo e o transtorno.

Vale salientar, no entanto, que os valores médios de ingestão apresentados ficam entre 5 e 12 g, tanto em testes no escuro quanto no claro, o que difere dos valores apresentados por sujeitos da mesma linhagem em testes realizados de forma semelhante, como por exemplo por Pereira e Sérgio (2010), que ficaram acima de 20 g. Isso indicaria que não somente o momento do teste, mas alguma outra variável pode ter produzido a diferença entre os resultados de Pereira e Sérgio e dos estudos do grupo de Willner, o que traz a necessidade de mais investigação para esclarecimento.

Com relação ao peso, o Grupo Protocolo apresentou ganho mais lento que o Grupo Controle (aproximadamente metade do ganho de peso semanal desse grupo). Não foram encontradas diferenças no ganho de peso entre sujeitos que passaram pelo teste no claro e no escuro. Analisando o consumo de sacarose relativo ao peso apenas para os grupos testados no escuro (visto que foram os únicos que apresentaram efeito do protocolo), o consumo por grama de peso corporal mostrou a mesma relação mostrada pelo consumo absoluto, em que o protocolo produziu queda ao longo das semanas. Ou seja, nesse estudo não foi encontrada a relação demonstrada por Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996) sobre a ausência de efeito quando calculado o consumo de sacarose relativo ao peso corporal. D'Aquila et al.

(1997) colocam que isso não ocorre no estudo realizado por eles, uma vez que o peso dos sujeitos é reduzido em torno de 4%, enquanto o consumo em torno de 27%. Dessa forma, mesmo havendo redução em ambos, pelo fato da redução no consumo ser muito maior que a redução no peso, o efeito é observado mesmo quando se faz o cálculo relativo. Os autores colocam que isso poderia decorrer do protocolo de estressores utilizado por Matthews et al. e Forbes et al. ter maiores e mais frequentes períodos de privação, o que acarretaria maior perda de peso. Mesmo assim, ressaltam que no estudo original de Willner et al. (1987), os períodos de privação também eram maiores, mas ainda assim o efeito de redução no consumo de sacarose foi observado. Quanto a isso, os autores não discutem se para o estudo de 1987 o cálculo de consumo relativo ao peso seria semelhante ao encontrado por Matthews et al., apenas colocam que por esse motivo os longos e frequentes períodos de privação foram removidos de seus estudos com o passar do tempo.

D'Aquila et al. (1997) colocam também que Forbes et al. (1996) encontraram redução no consumo de sacarose quando apenas os regimes de privação de alimento e água foram implementados, sem os demais estressores presentes. Comparando esse resultado com o encontrado por Muscat e Willner (1992), em que um regime de privação de alimento em que os sujeitos tinham uma hora de acesso por dia foi implementado, e não foram observadas mudanças no consumo de sacarose, D'Aquila et al. afirmam que possivelmente o regime de privação ocasional e imprevisível, como o aplicado por Forbes et al., em si, poderia ter funcionado como um estressor. Isso atestaria, mais uma vez, que não é a perda de peso que acarreta as mudanças observadas, mas a aplicação de um procedimento estressor (mesmo com relação apenas à dieta dos sujeitos).

Uma segunda análise realizada foi a de correlação entre o peso e o consumo teste a teste (ou seja, para cada semana do experimento). Os autores observaram não haver relação significativa para o Grupo Controle, enquanto para o Grupo Protocolo eles foram negativamente correlacionados, ou seja, animais mais pesados tomaram menos sacarose em cada teste, e animais menos pesados tomaram mais. Uma hipótese que levantam é a de que isso poderia decorrer de déficit calórico ou desidratação (decorrentes da privação), que seriam “compensados” com o maior consumo. Portanto, como apresentam queda no consumo de sacarose ainda assim, não somente é atestado o fato de que o protocolo produz os efeitos de menor sensibilidade à recompensa (anedonia), mas ainda é possível afirmar que esse efeito estaria minimizado. Isto porque se não houvesse a privação, que acarreta o déficit calórico, desidratação e perda de peso, a queda no consumo de sacarose seria ainda maior. No entanto, analisando essa lógica de que sujeitos menos pesados consomem mais sacarose por conta da

“compensação”, o protocolo deveria sempre aumentar o consumo de sacarose, e não reduzi-lo. Além disso, sujeitos que fossem submetidos apenas à privação, e não aos demais estressores, o que faria com que ficassem menos pesados, deveriam apresentar o maior consumo se comparados a sujeitos controle ou submetidos ao protocolo como um todo, o que não ocorre com esses grupos no estudo de Forbes et al. (1996).

Levando todos os relatos acima em consideração, portanto, foi proposta no presente estudo a utilização do protocolo de estressores de D’Aquila et al. (1997), já que esse protocolo demonstrou efeitos com a linhagem *Wistar*, a mesma aqui utilizada, com o teste de ingestão e preferência sendo realizado no início do período de escuro, para um grupo de sujeitos (Grupo Protocolo), e a submissão à privação de água presente no protocolo para outro grupo (Grupo Privação), bem como a utilização de um Grupo Controle.

Diferentemente de Pereira e Sérgio (2010), no entanto, o presente estudo optou por isolar apenas a privação de água, e não ambas, água e alimento, para (a) avaliar não apenas se a privação é capaz de produzir as alterações encontradas no consumo pela submissão ao protocolo, mas qual seria a privação (água ou alimento) crítica para isso, (b) avaliar a privação de água, já que Muscat e Willner (1992) avaliaram apenas a privação de alimento, (c) comparar os resultados com os encontrados por Hatcher et al. (1997), em que apenas a privação de alimento mostrou efeito, e a privação de água não.

Optou-se no presente estudo pela utilização desse protocolo de estressores pelas seguintes razões: (1) no estudo de 1997, foi utilizada a mesma linhagem utilizada aqui – *Wistar* –, tendo sido produzido o efeito de diminuição na preferência e ingestão de sacarose pelos sujeitos naquela ocasião; (2) foi apontada em 1997 a relação entre o período do ciclo claro/ escuro em que o teste é realizado com o efeito na ingestão e preferência para essa linhagem; (3) esse resultado diferiu da falha em encontrar efeitos quando utilizou-se o protocolo idêntico ao de Willner et al. (1987) com essa mesma linhagem, como por exemplo em Pereira e Sérgio (2010).

Optou-se aqui também pela realização de três medidas de linha de base para, assim como, por exemplo, em Muscat e Willner (1992) e D’Aquila et al. (1997), e diferentemente de Willner et al. (1987), ser possível ter uma medida mais estável de ingestão e preferência para posterior comparação com as medidas durante e após o protocolo de estressores ou a privação de água a que os sujeitos seriam submetidos. Além disso, diferente de Pereira e Sérgio (2010), que realizaram 12 testes antes do protocolo, prevenir que os períodos de privação e o número de exposições à sacarose fossem excessivos.

MÉTODO

Sujeitos

Foram utilizados neste experimento 15 ratos machos, experimentalmente ingênuos, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os sujeitos foram adquiridos com 40 dias de idade. Conforme informação do biotério de proveniência, os sujeitos foram alojados em conjunto com a mãe e o restante da ninhada até o desmame, que ocorreu aos 21 dias. Posteriormente, foram alojados em grupos de cinco sujeitos do mesmo sexo por caixa.

Alimento e água foram mantidos livres constantemente, com exceção dos períodos em que foi empregado o procedimento de privação de algum dos itens, conforme será descrito. As condições de iluminação, temperatura e umidade foram controladas, sendo a temperatura mantida entre 22 e 25° Celsius. Quanto à iluminação, os ciclos foram sempre mantidos em 12 horas claro/ 12 horas escuro, porém inicialmente das 20h às 8h – 8h às 20h, passando para 18h às 6h – 6h às 18h. Essa mudança ocorreu porque assim que os sujeitos chegaram ao biotério, foi mantido o horário de ciclo conforme procedimento padrão utilizado neste local (20h às 8h – 8h às 20h). No entanto, ao decidir qual seria o protocolo de estressores a ser utilizado, ajustou-se o ciclo ao proposto nesse protocolo, que realiza os testes de consumo e preferência no período de escuro. Para tanto, uma semana antes do início da exposição inicial dos sujeitos à sacarose (conforme será descrito), fez-se a mudança do horário da seguinte maneira: em um dia alterou-se uma hora, passando o ciclo para 7h – 19h, e 48 horas depois, fez-se o ajuste final, passando então o ciclo para 6h – 18h.

Desde a chegada ao biotério do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, os sujeitos permaneceram alojados em uma sala isolada, sempre mantida com a porta fechada, evitando ao máximo que passassem por qualquer forma de estresse não previsto por convívio com outros animais ou exposição a som ou iluminação indesejáveis. Assim que foram subdivididos nos grupos (conforme será descrito no procedimento), alguns sujeitos permaneceram nessa mesma sala (aqueles que seriam expostos ao protocolo), e os demais foram alojados em uma segunda sala em que os sujeitos de uma outra pesquisa (já finalizada) também estavam alojados. Pelo fato de apenas duas pesquisadoras manipularem tais sujeitos, e serem orientadas a manter o ruído em nível mínimo e cuidado com os sujeitos, considerou-se que as condições de alojamento dos dois grupos mantiveram-se semelhantes.

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisas com Animais, da mesma instituição, para aprovação do uso dos sujeitos na presente pesquisa (protocolo número 012.2012, ofício 013/13 – CEPA-IP).

Equipamento

Balança. O equipamento utilizado para medida de peso dos sujeitos, da água e do alimento, da sacarose em pó e de cada uma das garrafas de líquidos previamente e após os testes foi uma balança da marca Filizola®, com precisão de 1 g.

Caixas viveiro. Foram utilizadas caixas viveiro da marca Alesco®, confeccionadas em polisulfona, de dimensões 34x21x18 cm e forradas com serragem para alojamento individual dos sujeitos.

Sacarose. Foi utilizada sacarose microbiológica ($C_{12}H_{22}O_{11}$) P.A.-A.C.S, proveniente do laboratório Synth®.

Garrafas. Foram utilizados bebedouros da marca Alesco®, modelo Topázio, com capacidade para 700 ml, confeccionados em polisulfona, com tampas com rosca e bico em aço inoxidável.

Estressores. Foram utilizados os seguintes equipamentos, que compõem o protocolo de estressores (pormenorizadamente descrito adiante):

- a. suporte triangular de madeira, de dimensões 26 x 37 x 29 cm, colocado embaixo da estante de alojamento dos sujeitos, para propiciar inclinação da gaiola viveiro em 45° para trás.
- b. luz estroboscópica mini estrobo da marca Starlux®, 14 W, intensidade de 1 a 10 flashes por segundo, frequência 50/ 60 Hz, 127 V.

Procedimento

A partir da chegada ao laboratório (aos 40 dias de vida), os sujeitos foram alojados individualmente. Iniciou-se então a pesagem dos sujeitos (ver Figura 1). Na primeira semana, os sujeitos foram pesados por cinco dias consecutivos, para acompanhamento da adaptação dos mesmos ao novo biotério (pela verificação de perda ou ganho de peso atípicos, caso ocorressem). Na semana seguinte, foram pesados em três dias não consecutivos, alternando-se um dia com pesagem seguido de um dia sem pesagem, com a mesma finalidade (acompanhamento da adaptação dos sujeitos). A partir de então e até o início dos testes semanais, foram pesados duas vezes por semana. Iniciados os testes, passaram a ser pesados

semanalmente, imediatamente antes da realização do teste. A pesagem semanal foi adotada a partir desse momento para menor interferência possível com os demais procedimentos (o teste em si, a privação precedente a ele, em seguida o protocolo de estressores e a privação de água), e por ter sido o mesmo procedimento adotado por Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996), que tinham por objetivo investigar a relação do consumo de sacarose com o peso corporal. Para realização da pesagem, os sujeitos eram transportados em sua caixa viveiro da sala em que estavam alojados até o local onde ficava a balança (corredor do biotério), mudados de caixa para realização da pesagem e devolvidos em suas caixas. Após finalizado esse procedimento, eram devolvidos à sala de alojamento. A pesagem foi realizada em diferentes dias da semana antes do início dos testes de ingestão e preferência (conforme relatado anteriormente) e, com seu início, passaram a ser realizadas nas terças-feiras, logo antes do início do teste (ou seja, após privação de alimento e água de 23 horas).

Para aferição do consumo de água (e posteriormente também de sacarose diluída em água), as garrafas eram pesadas antes de serem colocadas na caixa viveiro dos sujeitos e, novamente, quando retiradas. Portanto, o valor de consumo de água também era medido em gramas. O mesmo ocorria com o alimento. No caso do alimento, não era possível realizar a pesagem das sobras que caíam dentro da caixa viveiro, já que essas se misturavam com a serragem. Portanto, era pesado apenas o restante de alimento que permanecia no compartimento externo em que o alimento é colocado (na grade metálica – tampa – da caixa viveiro), assim como realizado por Muscat e Willner (1992) quando realizado o procedimento de aferição de consumo de alimento. Esse procedimento foi realizado antes do início do procedimento, para aferição do consumo de cada um dos itens por cada sujeito previamente ao início dos procedimentos de privação, e continuou a ser realizado até o fim do experimento.

Aos 94 dias de vida dos sujeitos, foi realizado o procedimento de 48 horas de exposição à sacarose (ver Figura 1), conforme realizado em diversos estudos do grupo de Willner (e.g. Willner et al. 1987; Muscat & Willner, 1992). Uma garrafa contendo sacarose a 2%¹⁶ (conforme D'Aquila et al., 1997) foi colocada na gaiola viveiro dos sujeitos no lugar da garrafa de água, permanecendo disponível o alimento, por um período total de 48 horas. O procedimento foi iniciado às 19 horas do sábado e finalizado às 19 horas da segunda-feira

¹⁶ O preparo da sacarose dissolvida em água a uma concentração de 2% era realizado pesando-se uma parte de água (980g) e uma parte de sacarose (20g) e misturando-se os dois.

quando, então, sacarose e alimento foram removidos, iniciando-se o primeiro período de privação de 23 horas precedente ao primeiro teste de ingestão e preferência.

Na terça-feira, das 18 às 19 horas, foi realizado o teste (primeiro teste de Linha de Base - Teste LB1). A partir de então até o fim do experimento, os testes foram realizados semanalmente, às terças-feiras, das 18 às 19 horas. Para a realização de todos os testes desde o início até o final do experimento, o mesmo procedimento de privação foi então adotado: todos os sujeitos eram privados de alimento e água por 23 horas (o alimento e a água eram sempre retirados na segunda-feira às 19 horas). Ou seja, todos os testes foram realizados em condições de restrição hídrica e alimentar idêntica para todos os sujeitos¹⁷. Isso foi feito para que a condição de teste fosse a mais parecida possível entre os diferentes grupos, para possibilitar a comparação entre eles.

No momento do teste, eram disponibilizadas na caixa viveiro dos sujeitos duas garrafas previamente pesadas, uma contendo água e outra água com sacarose a uma concentração de 2%. Quando as garrafas eram retiradas eram novamente pesadas, para aferição da quantidade ingerida por cada sujeito. A cada teste, o lado de apresentação inicial das garrafas diferiu, ou seja, se no primeiro teste a garrafa contendo sacarose foi primeiramente apresentada do lado direito e a água do lado esquerdo, no segundo teste ocorreu o inverso (água do lado direito e sacarose do lado esquerdo). Além disso, durante o mesmo teste, foi também adotado o procedimento de balanceamento entre os lados de apresentação dos líquidos (também conforme D'Aquila et al., 1997). Para isso, transcorridos 30 minutos do início do teste, as duas garrafas eram retiradas, sendo colocadas duas novas garrafas em posição diferente das anteriores: se sacarose estava na esquerda, era colocada na direita, e o mesmo com a água. Essas garrafas também eram pesadas previamente à disponibilização e logo após sua retirada, para aferição da quantidade consumida.

Foram realizados no total três testes de linha de base com todos os sujeitos (Teste LB1, Teste LB2 e Teste LB3), conforme D'Aquila et al. (1997). A partir do consumo aferido no último teste de linha de base, também conforme D'Aquila et al., os sujeitos foram divididos em três grupos: Grupo Protocolo, Grupo Privação e Grupo Controle. A divisão foi realizada de modo a distribuir os sujeitos igualmente pelo consumo e preferência por sacarose em cada grupo, a partir da quantidade ingerida no último teste de linha de base. Cada grupo foi composto por cinco sujeitos.

¹⁷ Aqui, considera-se idêntica a restrição imediatamente antecedente (do dia anterior até o momento do teste), e não todo o procedimento de restrição pelo qual os sujeitos estariam passando (protocolo de estressores ou privação de água).

Manteve-se idêntica para os três grupos a condição de teste semanal de ingestão e preferência por sacarose. Serão descritos a seguir os diferentes procedimentos a que cada grupo foi submetido a partir desse momento do experimento.

Grupo Protocolo de Estressores

Terminado o terceiro teste de linha de base na terça-feira às 19 horas, os sujeitos desse grupo foram submetidos ao protocolo de estressores, iniciado na quarta-feira, idêntico ao utilizado por D'Aquila et al. (1997).

Compuseram o protocolo de estressores os seguintes estímulos:

- a. agrupamento: dois sujeitos são colocados em uma mesma gaiola. A cada agrupamento, a gaiola de colocação dos sujeitos se alterna entre a gaiola de um e de outro (ou seja, uma vez o sujeito recebe o outro em sua gaiola e, na vez seguinte, é recebido pelo outro sujeito na gaiola dele).
- b. luz estroboscópica: uma luz estroboscópica que dispara 300 flashes por minuto é ligada, enquanto a luz da sala é desligada (durante o período de claro do ciclo, a luz é apagada e “substituída” pela luz estroboscópica). Essa luz é posicionada em uma estante na frente da estante dos sujeitos, a aproximadamente 1,5 m de distância, na mesma altura em que eles estão posicionados, de modo a que todos os sujeitos fiquem de frente para ela.
- c. privação de comida: o alimento é retirado da gaiola por um período de tempo e, terminada a privação, é devolvido. Ou seja, durante o período de privação de comida, nenhum alimento estava disponível para consumo do sujeito.
- d. privação de água: a água é retirada da gaiola por um período de tempo e, terminada a privação, é devolvida. Ou seja, durante o período de privação de água, nenhuma garrafa com água estava disponível para consumo do sujeito.
- e. inclinação da gaiola: a estante em que as gaiolas viveiros dos sujeitos estão alojadas é inclinada em 45° para trás, utilizando-se para isso um suporte de madeira triangular apropriadamente desenhado, que é colocado embaixo da estante. Para não haver risco de queda das gaiolas, elas são amparadas por fios metálicos que ligam-nas à estante, de modo a que não haja mobilidade das mesmas durante o período de inclinação.
- f. alojamento em gaiola pequena (confinamento): os sujeitos são alojados em gaiolas próprias para camundongos, que medem 27 x 16 x 12 cm, sendo portanto seu espaço de alojamento reduzido consideravelmente (dado que as gaiolas originais medem 34 x 21 x 18 cm).

A sequência de apresentação dos estímulos ocorreu de maneira idêntica ao que ocorreu no estudo de D'Aquila et al. (1997), em ciclos de sete dias, sendo o mesmo ciclo repetido seis vezes, totalizando seis semanas de submissão ao protocolo. Na Tabela 1 é ilustrado um ciclo (uma semana) e a distribuição dos estressores por dia.

Grupo Privação de água

Também após terminado o terceiro teste de linha de base na terça-feira às 19 horas, iniciou-se com os sujeitos desse grupo o procedimento de privação de água idêntico ao do protocolo de estressores utilizado por D'Aquila et al. (1997). Portanto, os sujeitos desse grupo passaram apenas pelos períodos privação de água ocorridos no protocolo, e por nenhum dos demais estressores nele previstos (e.g. agrupamento, gaiola suja). Assim como para o Grupo Protocolo, o ciclo foi repetido por seis semanas.

Na Tabela 2, é ilustrado o ciclo semanal para esse grupo dados os procedimentos realizados com ele.

Vale salientar que, antes do teste semanal de ingestão e preferência, os sujeitos eram privados não apenas de água, mas também de alimento. Isso ocorreu, conforme já descrito, para que a situação de teste se mantivesse semelhante entre os três diferentes grupos.

Grupo Controle

Finalmente, o Grupo Controle foi submetido apenas à situação de testes de ingestão e preferência por sacarose semanais, desde o início até o final do experimento. Antes dos testes, os sujeitos eram privados de alimento e água por 23 horas, conforme previamente relatado. Portanto, além dos testes, o único procedimento a que os sujeitos desse grupo foram submetidos foi a restrição de alimento e água das 19 horas de segunda-feira às 18 horas de terça-feira.

Tabela 2

Ciclo de sete dias de apresentação apenas do estressor “privação de água”. Na coluna das horas, o período de escuro é indicado pela cor cinza, e o período de claro pela cor branca.

Dias da semana							
Hora	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SAB	DOM
1							
2							
3							
4							
5						Privação de água	
6							
7							
8		Privação de comida e água					
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18		TESTE					
19							
20							
21	Privação de comida e água				Privação de água		
22							
23							
24							

Após o final do protocolo de estressores (Grupo Protocolo), dos ciclos de privação de água (Grupo Privação) ou apenas dos testes (Grupo Controle), os sujeitos passaram por mais três testes de ingestão e preferência (Testes AP1, AP2 e AP3). Os testes foram iniciados uma semana após o fim de cada um dos procedimentos (protocolo ou privação), e foram idênticos aos demais: após um período de privação de água e alimento de 23 horas, iniciado na segunda-feira às 19 horas, os sujeitos tiveram disponibilizadas por uma hora as duas garrafas, uma contendo sacarose a 2% e a outra água, às 18 horas da terça-feira. Diferiu, nesses testes, o fato de que nenhum estressor ou privação estavam sendo empregados para nenhum dos grupos nos demais dias da semana. Além disso, entre o penúltimo teste (AP2) e o último teste (AP3) não foi possível manter o intervalo de uma semana (sete dias), mas de apenas cinco

dias entre um teste e outro. Mesmo assim, todos os demais procedimentos foram mantidos para o último teste (privação precedente, horário do teste, disponibilização das garrafas, alternância de posição, etc).

Na Figura 1 é possível visualizar uma linha do tempo, semelhante à encontrada em Tomanari, Pine e Silva (2003) e Pereira e Sérgio (2010), que sintetiza o procedimento a que cada Grupo foi submetido em cada momento do experimento.

Figura 1. Linha do tempo das condições experimentais a que os sujeitos foram submetidos.

RESULTADOS

1. Ingestão e preferência por sacarose

Na Figura 2, são mostrados os valores médios de ingestão de sacarose e de água nos testes semanais de ingestão e preferência para cada um dos Grupos.

Figura 2. Valores médios de ingestão de sacarose e água por grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) nos testes de ingestão e preferência realizados semanalmente durante a Linha de Base 1, 2 e 3 (LB1, LB2 e LB3), a exposição ao protocolo de estressores ou à privação por seis semanas (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e aos testes após protocolo ou privação 1, 2 e 3 (AP1, AP2 e AP3).

Os valores médios de ingestão de sacarose para o Grupo Controle apresentam aumento do primeiro para o segundo teste de LB (de 19,6 g para 23,4 g) e, em seguida, observa-se que há uma redução nessa ingestão com o decorrer dos testes (19,2 g no Teste 1, 17,4 g no Teste 2 e 15 g no Teste 3), com um pequeno aumento no quarto teste (18,2 g), mas novamente seguido de redução nos dois testes seguintes. Na semana AP1, ocorre novamente aumento no

consumo (19,8 g), sendo então o consumo semelhante ao apresentado nos testes iniciais. É observada então nova queda no teste seguinte, e um pequeno aumento no último teste (16,2 g). O consumo final e o consumo da maioria dos testes é menor que o inicial, o que leva à conclusão de que há uma tendência de queda no consumo de sacarose com o passar do tempo (lembrando que esses sujeitos não estavam sendo submetidos a nenhum procedimento a não ser a privação de alimento e água de 23 horas precedente aos testes, os testes semanais e a pesagem).

Com relação à ingestão de água, o consumo é sempre menor que o consumo de sacarose, além de apresentar valores mais semelhantes comparando-se um teste com o outro (menor variação nos valores ao longo dos testes). Observa-se apenas no nono teste (Teste 6) um consumo de água superior aos demais testes (quase o dobro do que havia ingerido no teste anterior, por exemplo). Nos demais testes, o consumo se mantém semelhante entre um teste e outro.

Na Figura 3, observam-se os consumos de água e sacarose (ordenada esquerda) bem como a preferência por sacarose (ordenada direita) em cada teste para cada sujeito do Grupo Controle. Assim como ocorreu quando analisado o consumo médio de sacarose para esse grupo, o consumo nos testes finais é menor que o consumo nos testes iniciais para os Sujeitos 1, 2 e 3. Para o Sujeito 4, o consumo manteve-se em valores parecidos com o passar do tempo. Para o Sujeito 5, a partir do terceiro teste de linha de base, o consumo de sacarose e de água parece alternar em preferência de um teste para o outro, não havendo preferência sistemática por nenhum dos líquidos. O que parece haver é uma preferência pela posição da garrafa. Essa possibilidade é levantada pelo fato de que a cada teste a posição inicial de água e sacarose era alternada. Então, se o sujeito preferisse um dos lados, especificamente, a cada teste seria apresentada preferência por um dos líquidos. Mesmo com a troca de posição dos líquidos na metade do teste, a preferência pelo lado foi demonstrada pelo fato dos sujeitos consumirem a maior parte do total de líquidos durante a primeira metade do teste.

Figura 3. Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Controle em cada teste realizado durante todo o experimento.

Com relação à água, os resultados individuais são muito similares ao apresentado pela média do grupo. Para os Sujeitos 1 e 2, o consumo aumenta um pouco com o passar dos testes, atingindo seu maior valor depois da metade do experimento. Para os Sujeitos 3 e 4, a ingestão de água se mantém mais constante ao longo de todo o experimento. Especificamente no nono teste (Teste 6), o consumo de água é o maior apresentado para os Sujeitos 2, 4 e 5, e o segundo maior para os Sujeitos 1 e 3. Por isso, quando analisada a média (Figura 2), esse ponto representa também o teste com maior consumo médio de água apresentado pelo Grupo Controle. Infere-se, portanto, que nesse teste, alguma variável não controlada possa ter afetado o consumo de água, visto que todos os sujeitos do Grupo Controle tiveram o mesmo efeito no consumo aferido no teste. Para o Sujeito 5, conforme colocado anteriormente, o consumo de água alterna de um teste para o outro, não apresentando padrão sistemático de menor consumo de água que de sacarose (o consumo de água é maior que o de sacarose em cinco dos 12 testes).

Analisando-se a ingestão média de sacarose para o Grupo Protocolo (Figura 2), observa-se que nos testes de linha de base (LB1, LB2 e LB3) a ingestão aumenta gradualmente (de 18,4 g no primeiro para 19,4 g no segundo e 20 g no terceiro). Iniciado o protocolo de estressores, no entanto, essa ingestão apresenta redução (18,8 g) na primeira semana e redução maior no segundo teste durante essa condição (13,2 g). No teste seguinte, esse consumo volta a se elevar (19,2 g), com uma queda em seguida (17,4 g) e novo aumento nos dois últimos testes durante o protocolo (18,2 e 19,2 g). Finalizado o protocolo, na primeira semana após a suspensão dos estressores, observa-se novamente uma queda na ingestão de sacarose (17,2 g), seguida de um novo aumento (17,8 e 18,4 g). Mesmo assim, da mesma forma que o Grupo Controle, em nenhum momento desde que iniciado o protocolo de estressores, o valor de ingestão de sacarose médio alcança ou ultrapassa o valor do último teste de linha de base (LB3).

O consumo médio de água para o Grupo Protocolo se mantém estável ao longo de todo o experimento. Iniciado o protocolo, há uma pequena redução no consumo (de 6,2 g para 5,4 g) e, finalizado o protocolo, o consumo volta a ficar semelhante ao consumo apresentado nos testes de linha de base (volta a valores próximos de 6 g).

Figura 4. Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Protocolo em cada teste realizado durante todo o experimento. As duas interrupções na continuidade das linhas significam, respectivamente, o início e o fim do protocolo de estressores.

Na Figura 4 são mostrados os consumos individuais de água e sacarose para os sujeitos do Grupo Protocolo. Também para o Grupo Protocolo, os consumos individuais se assemelham ao que é observado na análise da média para os Sujeitos 1, 2, 3 e 4. Para o Sujeito 5, a aparente tendência de queda apresentada nos testes de linha de base é modificada no primeiro teste durante o protocolo, em que o consumo é maior que o apresentado até então (o consumo no Teste LB3 foi de 20 g, passando a 25 g no Teste 1). Das semanas subsequentes em que esteve exposto ao protocolo de estressores, apenas em uma delas apresentou queda no consumo de sacarose, no Teste 2, em que consumiu 6 g, quantidade muito próxima ao consumido de água nesse teste (5 g). A partir de então, o consumo voltou a aumentar, chegando aos maiores valores ainda durante o protocolo. Após a suspensão do protocolo, o Sujeito 5 volta a apresentar valores de ingestão semelhantes aos apresentados em linha de base. Portanto, para esse sujeito, diferente dos demais, não se pode afirmar que há redução na ingestão de sacarose durante ou depois a exposição ao protocolo de estressores, visto que os maiores valores consumidos ocorreram justamente durante a exposição ao protocolo. É possível afirmar, então, que o padrão médio e individual de consumo de sacarose é semelhante entre os Grupos Protocolo e Controle.

Com relação ao consumo de água, também individualmente, é possível identificar que para os sujeitos do Grupo Protocolo ele muda pouco de um teste para o outro, não havendo, como no caso do Grupo Controle, um teste em que há destaque para diferenças nessa medida.

Com relação ao Grupo Privação, analisando-se o consumo médio para o grupo (Figura 2) ocorreu algo semelhante ao que ocorreu com o Grupo Protocolo. Nos testes de linha de base, há aumento na ingestão média de sacarose (de 18,2 g no primeiro para 18,6 g no segundo e 20,2 g no terceiro). A partir do início do procedimento de privação, também já na primeira semana, observa-se redução no consumo médio de sacarose para os sujeitos desse grupo (17 g), seguida de nova queda no segundo teste (14,4 g). A partir de então o consumo aumenta no terceiro e quarto testes (18 g e 18,4 g), tem uma queda no quinto (16,6 g) e novo aumento no último teste (18,2 g), mas ainda assim não chegando ao consumo apresentado em linha de base. Finalizado o procedimento de privação, a ingestão apresenta valores muito semelhantes nos três testes finais (os valores de ingestão média nos três últimos testes são de, respectivamente, 17,8 g, 17,8 g e 18,2 g). Para esse grupo, portanto, assim como para o Grupo Protocolo, ocorre o seguinte processo: há um pequeno aumento na ingestão de sacarose durante a linha de base; iniciado o procedimento de privação (no caso do outro grupo, o protocolo de estressores), há uma queda na ingestão, que não é acompanhada pela queda no consumo de água; durante o procedimento de privação/ protocolo de estressores, essa

diminuição na ingestão de sacarose é seguida por um aumento, e manutenção após finalizado o procedimento. Mesmo assim, o aumento ocorrido não produz retorno dos valores de ingestão aos valores observados em linha de base, ou seja, mesmo ocorrendo aumento no consumo de sacarose, ele não ultrapassa o valor consumido antes do início do procedimento de privação/ protocolo de estressores.

O consumo de água é um pouco maior e também ligeiramente mais variável que o consumo de água do Grupo Protocolo durante as semanas em que ambos estiveram em vigor (Testes 1 a 6). No Teste 2, há um aumento no consumo (de 5,8 g para 7 g), e um aumento ainda maior no Teste 4 (de 6 g no Teste 3 para 8,8 g). Nos testes subsequentes, o consumo apresenta valores mais semelhantes entre si, ficando entre 6,4 g e 7,2 g.

Na Figura 5, são também mostrados os valores de ingestão de água e sacarose e preferência por sacarose para cada sujeito do Grupo Privação. Também para esse grupo, observa-se padrão individual semelhante ao encontrado na média. Com relação à ingestão de sacarose, observa-se um padrão de consumo que se assemelha entre os Sujeitos 1, 2, 3 e 4, e difere para o Sujeito 5 da mesma forma que ocorreu nos outros grupos. Os Sujeitos 1 a 4 apresentaram uma queda na ingestão de sacarose iniciado o procedimento de privação, considerando-se o último teste de linha de base (exceto para o Sujeito 4, que apresenta essa queda apenas na segunda semana de exposição ao procedimento de privação). No geral, esses sujeitos durante a privação apresentam consumo de sacarose menor que o apresentado durante a linha de base, o que se mantém com a suspensão do procedimento. Mesmo aumentando o consumo de sacarose após a suspensão, ele não chega aos valores apresentados em linha de base. O Sujeito 5, ao contrário dos demais, parece apresentar tendência de aumento no consumo de sacarose ao longo dos testes: aumento da linha de base para o início do período de privação, seguido de novo aumento no Teste 3, e valores de consumo menores, mas ainda acima dos valores de linha de base e dos Teste 1 e 2 nos Testes 4, 5 e 6. Isso se mantém nos testes após a suspensão do procedimento de privação.

Figura 5. Ingestão de sacarose e água de cada sujeito do Grupo Privação em cada teste realizado durante todo o experimento. As duas interrupções na continuidade das linhas significam, respectivamente, o início e o fim do procedimento de privação de água correspondente à privação do protocolo de estressores.

No consumo de água, também as variações individuais refletem o padrão encontrado na média. Parece haver primeiramente uma tendência de aumento e posteriormente de estabilidade no consumo de água com o decorrer dos testes para os Sujeitos 1 a 4, sendo os maiores valores apresentados durante a exposição à privação. Para o Sujeito 5, ao contrário, há primeiramente uma queda no consumo de água quando iniciada a privação, e posteriormente aumento (nas três últimas semanas do procedimento de privação, o que se mantém após o fim).

Em resumo, o Grupo Controle apresenta consumo final e consumo na maioria dos testes menor que o inicial, o que leva à conclusão de que há uma tendência de queda no consumo de sacarose com o passar do tempo para esse grupo. Para os Grupos Protocolo e Privação, observa-se um pequeno aumento na ingestão de sacarose durante a linha de base. Iniciado o procedimento de privação e o protocolo de estressores, há uma queda na ingestão, que não é acompanhada pela queda no consumo de água. Durante a submissão à privação e ao protocolo de estressores, essa diminuição na ingestão de sacarose é seguida por um aumento, e manutenção após finalizado o procedimento. Mesmo assim, o aumento ocorrido não produz retorno dos valores de ingestão aos valores observados em linha de base, ou seja, mesmo ocorrendo aumento no consumo de sacarose, ele não ultrapassa o valor consumido antes do início do procedimento de privação/ protocolo de estressores.

2. Peso corporal

São analisados a seguir o peso (médio e individual) para os sujeitos dos três grupos, bem como os padrões de perda ou ganho de peso apresentados durante o experimento, e posteriormente sua relação com a ingestão e preferência por sacarose, e com a ingestão de alimento e água.

Figura 6. Peso médio semanal de cada grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) antes do início dos testes (Semanas -7 a 0) e a partir do início dos testes (LB1) até o final do experimento.

Na Figura 6 são mostrados os pesos médios por semana, para cada grupo de sujeitos, antes e depois de iniciados os testes de ingestão e preferência. São mostrados os valores aferidos desde o desmame até o início dos procedimentos de teste de ingestão e preferência. A primeira semana de testes refere-se à primeira linha de base (Semana LB1). As semanas precedentes são numeradas em ordem decrescente, pois são as semanas que precedem o início dos procedimentos (testes, seguidos de protocolo e privação). Portanto, a semana anterior ao início dos testes é nomeada Semana 0, e as semanas prévias são nomeadas Semanas -1 a -7, nesta ordem.

Desde o desmame até o início dos testes, observa-se ganho de peso semanal constante para os três grupos. O peso médio apresentado pelos três grupos é muito semelhante até aproximadamente dois meses de idade, o que corresponde à Semana -4 mostrada na Figura, quando então o Grupo Protocolo passa a apresentar menor ganho semanal de peso em comparação aos demais grupos e o Grupo Controle passa a apresentar o maior ganho. Vale salientar que nesse momento do experimento nenhum dos grupos estava sendo submetido a nenhum procedimento, a não ser as pesagens semanais. Percebe-se também nessa figura que a partir de aproximadamente dois meses e meio de idade, o que corresponde à Semana -2, o ganho de peso semanal apresenta diminuição para todos os sujeitos, o que também ocorre da Semana -1 para a Semana 0, quando os sujeitos completam três meses de idade. Antes do início dos testes, na Semana 0, o Grupo Controle apresenta maior peso corporal que os demais, sendo seguido pelo Grupo Privação e então Grupo Protocolo. Portanto, havia uma tendência à diferenciação dos pesos antes do início dos procedimentos. Nesse momento do experimento, os sujeitos ainda não haviam sido divididos entre os grupos, o que ocorreu apenas depois dos três testes de linha de base (Semana LB3). Como o peso não foi utilizado como critério para a distribuição nos grupos, a distribuição desigual (em que um grupo já apresentava peso maior antes do início dos procedimentos) acabou ocorrendo com relação ao peso, o que explica a diferença entre os três grupos previamente ao início dos testes, diferença esta que aumenta a partir do momento que os grupos são expostos ao protocolo ou à privação, conforme será analisado.

Para realização dos testes, todos os sujeitos de todos os grupos eram submetidos à privação de alimento e água por 23 horas, conforme especificado no Método. Por esse motivo, observa-se a queda no peso da Semana 0 para a semana LB1 para todos os grupos. O peso médio apresentado na Semana 0 pelos sujeitos do Grupo Controle foi de 370,6 g, pelo Grupo Protocolo de 347,4 g, e pelo Grupo Privação de 359,8 g, passando a, respectivamente, 351,4 g, 328,4 g e 340,2 g após o primeiro período de privação de alimento e água de 23

horas (ou seja, previamente ao primeiro teste, LB1). Portanto, mesmo diferindo em peso absoluto, o primeiro período de privação afetou a todos os grupos de maneira semelhante com relação à redução de peso, visto que proporcionalmente a queda dos três grupos foi semelhante, o que pode ser observado pela semelhança na inclinação das curvas. Na semana seguinte todos os grupos apresentaram aumento no peso, semelhante para os Grupos Controle e Protocolo, e um pouco menor para o Grupo Privação. Ao final da linha de base (Semana LB3), os pesos dos três grupos atingiu valores semelhantes ao peso anterior ao início da primeira privação para o teste (peso da Semana 0), sendo o peso ligeiramente maior para o Grupo Controle que para os demais nessa semana.

Durante os procedimentos de protocolo de estressores e privação de água, observa-se aumento da diferença entre os pesos médios apresentados pelos Grupos Protocolo e Privação com relação ao Grupo Controle. Essa diferença era de aproximadamente 30 g entre os Grupos Controle e Protocolo na Semana 1, aumentando progressivamente (assim como já ocorria em linha de base) e chegando a aproximadamente 39 g na Semana 6. Entre os Grupos Controle e Privação, essa diferença era de aproximadamente 22 g na Semana 1 e chega a 25 g na Semana 6. Ou seja, a diferença aumenta entre o Grupo Controle em comparação aos Grupos Protocolo e Privação. Pelo fato de diferirem com relação à privação a qual estavam sendo submetidos (maior privação de água para os Grupos Protocolo e Privação), pode-se supor que a diferença no peso dos três grupos se deva a isso.

Terminados os procedimentos de protocolo e privação, observa-se, já na primeira semana após sua suspensão, que para ambos os grupos ocorre ganho de peso maior do que vinha ocorrendo nas semanas anteriores. Isso se repete nas semanas seguintes. O Grupo Controle apresenta ganho de peso semelhante ao que vinha ocorrendo anteriormente (visto que nenhum procedimento diferente ocorre com esse grupo da Semana 6 para a Semana AP1). Na Semana AP1, com relação à Semana 6, o ganho de peso dos Grupos Protocolo e Privação foram proporcionalmente maiores que o ganho ocorrido para o Grupo Controle, que manteve o ganho de peso semanal que vinha apresentando até então. Ou seja, suspensa a privação, os pesos passam a ficar próximos.

Figura 7. Peso semanal individual para cada grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) a partir da Semana 0 até o final do experimento.

Na Figura 7, são mostrados os pesos individuais a partir da semana antes do início da privação precedente ao teste (Semana 0). Mesmo diferindo em valores absolutos, a evolução de peso individual é semelhante ao demonstrado na média para o grupo correspondente, especialmente para o Grupo Controle. No Grupo Controle, apenas o Sujeito 5 apresenta menor ganho de peso das Semanas 3 para 4 e AP1 para AP2, em que seu peso apresenta pequena queda, enquanto o dos demais sujeitos do grupo apresenta ganho. No Grupo Protocolo, na Semana 6, o sujeito 3 perde peso enquanto os demais apresentam aumento. Para o Sujeito 1 desse grupo, não há ganho de peso durante o protocolo até a Semana 5 como ocorre com os demais sujeitos do Grupo Protocolo. Com relação ao Grupo Privação, o Sujeito 5 apresenta maior ganho de peso das Semanas 1 a 4 que os demais sujeitos do grupo, e ocorre uma queda no peso da Semana 4 para a 5 também diferente do que ocorre com os outros sujeitos do grupo. Também discrepante dos demais é a evolução de peso do Sujeito 3 do Grupo Privação a partir da Semana 6. Até então, seu padrão de ganho de peso se assemelhava aos sujeitos do grupo.

Pelo fato da média de peso do Grupo Controle já apresentar diferença com relação aos demais grupos antes de iniciados os procedimentos (privação de alimento e água para teste, e protocolo e da privação de água para os grupos correspondentes – ver Figura 6), é realizada então a avaliação da evolução dessas diferenças, para possibilitar a atribuição dos efeitos aos procedimentos a que cada grupo estava sendo submetido. Foi calculado então o aumento de peso relativo à Semana 0 (anterior ao início dos testes), tomando o peso dessa semana como referência. Ou seja, a partir do peso médio por grupo apresentado nessa semana, os pesos aferidos nas semanas subsequentes foram calculados em termos de percentual de perda ou de ganho. Esses dados são apresentados na Figura 8. Observa-se que após a queda inicial de todos de aproximadamente 5% de seu peso *ad lib* há, para todos os grupos, ganho de peso semanal até o fim do experimento.

Na Figura 8, da mesma forma que na Figura 6, ainda durante a linha de base, observa-se que o peso médio do Grupo Controle aumenta ligeiramente mais que dos demais grupos. No Teste LB3, o peso médio do Grupo Controle já retornou a pouco menos de 1% acima do peso inicial, enquanto que para os Grupo Protocolo e Privação observa-se peso aproximadamente 1% abaixo do peso inicial (ambos estão ainda com peso abaixo da linha 0, que corresponde ao peso inicial). Ou seja, mesmo passando pelo mesmo procedimento (apenas privação prévia aos testes, para os três grupos), o Grupo Controle já apresenta diferença com relação aos demais quanto ao ganho de peso.

Figura 8. Porcentagem média de variação de peso semanal por grupo de Sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a semana precedente ao início dos testes de ingestão e preferência (Semana 0). Os valores acima da linha horizontal representam ganho de peso com relação ao peso inicial. Os valores abaixo da linha, perda de peso com relação ao peso inicial (em percentual).

Iniciados o protocolo e a privação para esses grupos, observa-se que o seu peso passa a apresentar média de porcentagem de aumento menor que o Grupo Controle, ocasionando maior distância entre os pesos médios dos grupos. Ou seja, a diferença que já existia em linha de base fica maior quando os sujeitos passam a ser submetidos ao protocolo e à privação. Já na primeira semana (Teste 1), o ganho de peso considerando-se a semana anterior (LB3) foi de 3% para o Grupo Controle, e 2% para os Grupos Protocolo e Privação. Da primeira para a segunda semana, o Grupo Privação apresentou ganho de peso de aproximadamente 3%, enquanto o Grupo Protocolo apresentou ganho de 1%. Esse maior ganho de peso do Grupo Privação se mantém na Semana 3, sendo revertido então na Semana 4, quando ambos os Grupos Protocolo e Privação passam a apresentar peso aproximadamente 6% acima do peso inicial. Nas Semanas 5 e 6, novamente, ambos apresentam ganho de peso muito semelhante,

entre 6% (Semana 5) e 8% (Semana 6) acima de seu peso inicial. O Grupo Controle, por sua vez, apresenta ganho de peso superior durante todo esse período, chegando a um peso 12% superior ao seu peso inicial na Semana 6. Ou seja, mesmo com peso inicial já superior aos demais grupos, percebe-se que a evolução de peso, comparando-se cada grupo com ele mesmo, é diferente dados os procedimentos a que estavam sendo submetidos, e que os Grupos Protocolo e Privação apresentam ganho de peso semanal semelhante entre si e diferente do Grupo Controle. Ou seja, a privação de água comum aos Grupos Protocolo e Privação e diferente do Grupo Controle parece ter sido o que afetou a evolução de peso de maneira semelhante entre os grupos submetidos a ela.

Finalizados o protocolo e a privação, observa-se maior ganho percentual de peso para os Grupos Protocolo e Privação do que para o Grupo Controle, que já vinha apresentando maior estabilidade no ganho de peso: aumento de aproximadamente 2%, 3% e 1%, respectivamente, com relação à Semana 6. Na semana seguinte, os pesos dos Grupos Protocolo e Privação voltam a aumentar, mais para o primeiro que para o segundo, chegando a, respectivamente, 13% e 12% acima do peso inicial, contra 14% do Grupo Controle. Ou seja, após duas semanas de suspensão do protocolo e da privação, o ganho de peso para esses dois grupos faz com que seu peso volte a se aproximar do peso do Grupo Controle em termos do ganho de peso acumulado. Portanto, o ganho de peso foi maior para os Grupos Protocolo e Privação, quando suspensos os respectivos procedimentos, o que indica que essas condições eram provavelmente as responsáveis pela evolução de peso que os sujeitos vinham apresentando até então. Na última semana, os valores com relação ao peso inicial praticamente se sobrepõem, ficando entre 13 e 14% para os três grupos.

Importante destacar que antes da implementação do protocolo de estressores ou da privação de água (Testes LB), a privação de alimento e água de 23 horas antecedente ao teste parece afetar a todos os sujeitos de maneira semelhante: os pesos semanais dos grupos variaram de maneira parecida, mesmo sendo os pesos absolutos diferentes. Porém depois de encerrados o protocolo e a privação (semanas AP), ocorre variação de maneira diferente: mesmo estando submetidos ao mesmo procedimento semanal (privação de alimento e água de 23 horas previamente ao teste), os Grupos Protocolo e Privação têm maior ganho de peso semanal que o Grupo Controle. Aparentemente o peso não adquirido durante as semanas em que o protocolo e a privação estavam em vigor é “compensado” com a sua suspensão, já que a privação de água é suspensa quando esses procedimentos terminam.

Mesmo apresentando maior média (ver Figuras 6 e 8) de ganho de peso anteriormente aos procedimentos, a diferença do Grupo Controle com relação aos demais fica maior durante

o protocolo e a privação. Provavelmente, o fato da privação ser mais acentuada nos grupos protocolo e privação fez com que durante os procedimentos o ganho de peso tenha sido menor para esses dois grupos do que para o grupo controle. Portanto, é possível afirmar que o peso corporal médio semelhante entre os dois grupos indicaria que o peso varia em função da privação de água presente no protocolo, e não em função da privação de alimento ou do protocolo como um todo.

Analisando-se a variação de peso individualmente considerando-se a Semana 0 como referência, ocorre um padrão semelhante para todos os sujeitos apenas nos Grupos Controle e Privação, mas não no Grupo Protocolo (Figura 9).

No Grupo Controle, o padrão de evolução de peso semanal é semelhante entre todos os sujeitos, diferindo apenas em valor absoluto entre eles. Ou seja, a média (Figura 8) reflete os padrões individuais para esse grupo. Apenas o Sujeito 5 apresenta uma queda no peso da Semana 3 para a Semana 4, e da Semana AP1 para a Semana AP2, mas no restante das semanas apresenta padrão semelhante aos demais.

No Grupo Privação, apenas a partir da Semana 5 dois dos cinco sujeitos (os Sujeitos 3 e 5) passam a apresentar evolução de peso diferente dos demais, diferindo, portanto, da média do grupo. Nas demais semanas e para os demais sujeitos, a média é representativa do padrão de ganho de peso para os sujeitos do Grupo Privação.

Para o Grupo Protocolo, observa-se que dois sujeitos não apresentam praticamente nenhum ganho de peso ao longo da submissão ao protocolo de estressores (Sujeitos 1 e 4). Ou seja, esses sujeitos foram os que provavelmente influenciaram a média do grupo de modo a mantê-la baixa durante a submissão ao protocolo. Os demais sujeitos do grupo apresentam ganho de peso durante todo o protocolo. Portanto, a média não é representativa do que ocorreu para todos os sujeitos desse grupo com relação ao ganho de peso ao longo das semanas de submissão ao protocolo de estressores.

Figura 9. Porcentagem de variação de peso semanal por indivíduo em cada grupo (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a semana precedente ao início dos testes de ingestão e preferência (Semana 0).

2.1 Relação entre peso e ingestão de sacarose

É realizada a análise do consumo de sacarose relativo ao peso corporal dos sujeitos. Inicialmente são analisados o peso médio semanal e a ingestão média semanal de sacarose em termos absolutos, para avaliar se as oscilações de peso acompanham as variações de consumo.

Na Figura 10, são apresentados o peso corporal semanal e o consumo de sacarose semanal médios para os Grupos Controle, Protocolo e Privação, a partir do início dos testes.

É possível observar na Figura 10 que ocorre aumento de peso em todas as semanas para os três grupos, durante todo o experimento (conforme já mostrado nas Figuras 6, 7, 8 e 9). No entanto, o consumo de sacarose não apresenta o mesmo aumento (conforme também já mostrado nas Figuras 2, 3, 4 e 5), ou seja, não há uma relação entre o aumento no peso e o aumento na ingestão de sacarose.

Além disso, a variação de peso durante todo o experimento foi de ganho máximo, em média, de 14% para o Grupo Controle, e 13% para os Grupos Protocolo e Privação, comparando-se o início dos testes com o peso final, enquanto que comparando-se com o último teste de linha de base, foram observadas quedas no consumo de sacarose de até 24,5% (teste da Semana 3), 32,7% (teste da Semana 2) e 26,5% (teste da Semana 2), respectivamente, para os três grupos.

A análise individual do consumo de sacarose relativo ao peso corporal não mostrou diferenças com relação à média. Portanto, esses dados não são aqui mostrados.

Dessa forma, pode-se concluir que no presente estudo não foi encontrada relação entre o consumo de sacarose e o peso corporal dos Sujeitos para nenhum dos grupos.

Figura 10. Ingestão de sacarose (ordenada esquerda) e peso corporal (ordenada direita) médios de cada grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) em cada teste realizado durante todo o experimento.

2.2 Relação entre peso e consumo de alimento e água

Na Figura 11 são apresentados os consumos médios semanais de água (painéis superiores) e alimento (painéis inferiores) para cada um dos grupos. Vale salientar que o consumo de água aqui apresentado refere-se ao consumo livre na gaiola viveiro quando esse item estava disponível, e não o consumo registrado nos testes de ingestão e preferência por sacarose. Esse consumo é apresentado para possibilitar a análise da evolução de peso não somente com relação ao procedimento a que cada grupo estava sendo submetido e à ingestão de sacarose, mas também com relação ao consumo de alimento e água. Para tanto, primeiramente serão apresentados os consumos de alimento e água, e então será feita a relação desses dados com os dados de peso corporal dos sujeitos. Os dados individuais de consumo de água e alimento não serão apresentados, visto que a média dos grupos é representativa dos valores individualmente encontrados.

O dado de consumo de água da Semana 0 para a Semana LB1 não pôde ser aferido, visto que durante a Semana LB1, nos dois dias precedentes à primeira privação para realização do primeiro teste de consumo e preferência, os sujeitos passaram pelo procedimento de exposição à sacarose por 48 horas no lugar da água pura, conforme especificado no método, portanto não foi aferido o consumo de água nessa semana.

Comparando-se o valor anterior à Semana 0 com o valor a partir da Semana LB1, é possível observar que o consumo médio de água cai para os três grupos de sujeitos a partir do início do período de 23 horas de privação semanal de alimento e água (Semana LB1) e permanece abaixo do valor apresentado anteriormente até o fim do experimento. Para o Grupo Controle, essa queda é constante até a última semana (AP3), em que apresenta um consumo semanal médio de água de 202 g, enquanto na Semana 0, previamente ao início dos testes, seu consumo semanal médio de água era de 358 g, o que equivale a uma redução de 43% no consumo de água do início para o final do experimento. Para o Grupo Protocolo, também observa-se uma queda no consumo de água a partir da Semana LB1. Da Semana LB3 para a Semana 1, quando então é iniciado o protocolo de estressores, há um aumento no consumo de água, mas durante as semanas subsequentes (durante o protocolo), o consumo volta a diminuir, tendo pequena elevação da Semana 3 para a Semana 4, mas mantendo-se em valores parecidos durante o protocolo. Da Semana 6 para a Semana AP1, quando então o protocolo é finalizado, é observado novo aumento, e valores semelhantes com ligeira queda da Semana AP2 para a Semana AP3. O consumo semanal médio de água que era de 282 g antes do início da privação semanal para o teste chega a 189 g na última semana do experimento, o que

equivale a uma redução de 33% no consumo de água do início para o final. Ou seja, o Grupo Protocolo também apresenta queda com o passar das semanas, assim como para o Grupo Controle. O Grupo Privação também apresenta um padrão semelhante no consumo de água em comparação aos demais grupos: oscilação com o passar das semanas, e queda comparando-se o consumo antes do procedimento de privação para os testes semanais com o consumo da última semana. Para o Grupo Privação, este consumo vai de 326 g para 178 g de consumo médio de água semanal, o que equivale a uma redução de 45% no consumo de água do início para o final do experimento.

No entanto, deve ser salientado que, iniciados os testes, durante o período de uma hora em que os sujeitos tinham acesso livre à sacarose diluída em água e à água pura, o consumo desses líquidos atingia valores médios equivalentes a mais da metade do consumo médio diário de cada grupo. Ou seja, a quantidade de líquido consumida durante um teste era equivalente a mais ou menos metade do que o sujeito consumia em um dia todo. Esse valor consumido não está registrado no consumo semanal de água dos sujeitos (visto que o líquido é diferente – sacarose – e o registro desse consumo é outro), o que pode ter ocasionado a aparente queda observada na Figura 11, mas que na realidade se referiria apenas a uma "troca" do líquido consumido.

Figura 11. Consumo semanal médio de água (painel superior) e comida (painel inferior) por grupo (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) desde antes início dos testes de ingestão e preferência (valor anterior à Semana 0) até a última semana do experimento (AP3).

O consumo de alimento cai para os três grupos na primeira semana de privação para realização dos testes (Semana 0 para Semana LB1). Para o Grupo Controle, esse consumo continua a cair gradualmente até o fim dos testes. O consumo semanal médio de alimento apresentado antes da Semana 0 para o Grupo Controle foi de 204 g, passando a 160,5 g da Semana AP2 para a AP3, o que equivale a uma redução de 21% no consumo de alimento do início para o final do experimento.

Para o Grupo Protocolo, é notada uma primeira queda no consumo de alimento quando iniciado o protocolo de estressores (Semana LB3 para Semana 1), com aumento posteriormente e nova queda da Semana 4 para a Semana 5 do protocolo. Já no final da exposição aos estressores, o consumo de alimento volta a aumentar, permanecendo em valores semelhantes até o final do experimento. Diferente do Grupo Controle, para o Grupo Protocolo observa-se que o consumo de alimento ao final do experimento não é muito menor que o consumo apresentado antes do início dos procedimentos: antes da Semana 0 era de 170 g em média por semana, e passa a 161 g da Semana AP2 para a AP3, uma queda que não chega a 6%. O que ocorre com o Grupo Protocolo é uma queda pontual no consumo de alimento durante o protocolo de estressores, provavelmente devida à privação de alimento a que estavam sendo submetidos nesse período.

Para o Grupo Privação, uma queda progressiva no consumo de alimento já ocorreu nas Semanas LB, se acentuando a partir da Semana 1 do procedimento de privação. No entanto, nas Semanas 1 a 6, em que o procedimento de privação de água esteve em vigor, o consumo de alimento se manteve em valores muito semelhantes semana a semana, não apresentando novas quedas. Da Semana 6 para a Semana AP1, quando então o procedimento de privação de água a que este grupo estava sendo submetido foi finalizado, um ligeiro aumento no consumo de alimento ocorreu. Ou seja, possivelmente a privação de água afetou também o consumo de alimento. O consumo final apresentado pelo Grupo Privação foi de 159 g de alimento por semana, quando o consumo inicial apresentado era de 192 g por semana, em média. Portanto, uma queda de aproximadamente 17%.

Na Figura 12 são analisadas as médias de consumo de alimento e água semanais relativas ao consumo médio apresentado em linha de base (Semanas LB1 a LB3), para melhor comparar um grupo com o outro. O consumo da linha de base é tomado como referência para comparação posterior visto que nessas semanas o procedimento a que os três grupos estavam sendo submetidos era o mesmo (apenas um período de privação de alimento e água de 23 horas por semana), alterando-se a partir da Semana 1 (quando são iniciados o protocolo de estressores e a privação de água para os grupos correspondentes).

Figura 12. Média de variação de consumo de água (painel superior) e comida (painel inferior) em percentual de variação semanal por grupo de sujeitos (Grupo Pro: protocolo; Grupo Pri: privação; Grupo Con: controle) tomando-se por base de referência (0) a média do consumo nas três semanas de linha de base (Semanas LB1, LB2 e LB3).

Observa-se que o consumo de água (painel superior) apresenta queda ao longo do experimento para os três grupos, em relação à linha de base. Apenas para o Grupo Protocolo ocorre aumento no consumo na primeira semana do protocolo, mas também é observada queda a partir da Semana 2. Para nenhum dos grupos há retorno do consumo de água aos valores apresentados em linha de base.

Vale salientar que o Grupo Controle não passou por nenhum procedimento diferente do ocorrido em linha de base. Ou seja, a queda no consumo de água observada para esse grupo não pode ser atribuída a nenhum procedimento específico. Interessante também notar que o Grupo Protocolo apresenta maior consumo de água que os demais grupos, proporcionalmente ao que consumiu em linha de base, nas Semanas 1, 3, 4 e 5 do protocolo de estressores, quando estava sendo submetido a uma privação de água mais intensa que o Grupo Controle e idêntica para o Grupo Privação, mas também privação de alimento mais intensa que ambos os demais grupos. Ou seja, mesmo tendo menor tempo de acesso à água que o Grupo Controle e menor tempo de acesso ao alimento que os Grupos Controle e Privação durante esse período, seu consumo não cai tanto quanto o dos demais grupos em comparação ao que vinha consumindo antes desse período. Portanto, pode-se inferir que durante o protocolo de estressores, os sujeitos do Grupo Protocolo consumiam água de maneira mais “rápida” do que o faziam antes, e do que os demais sujeitos, já que a quantidade consumida se mantém maior para esse grupo, mesmo tendo a água (e alimento, o que também afeta o consumo de água) disponível por menos tempo. O Grupo Privação, que teve a mesma restrição hídrica que o Grupo Protocolo, no entanto, apresenta a maior queda quando esse procedimento é iniciado. Isso pode dever-se ao fato de que a privação de alimento à qual o Grupo Protocolo foi submetido também afetou o consumo de água, fazendo com que o consumo de água apresentado por esse grupo fosse menor que o apresentado pelo Grupo Privação.

O consumo de alimento (painel inferior) do Grupo Controle apresenta uma queda em relação ao consumo da linha de base ao longo de todas as semanas, semelhante ao que ocorreu para o consumo de água desse grupo. Para o Grupo Protocolo, são observados os menores consumos em comparação ao que consumiu em linha de base nas Semanas 1, 2, 3 e 5 do protocolo. Ou seja, para esse grupo, o protocolo de estressores afetou o consumo de alimento de modo a que ele ficasse menor e mais variável de uma semana para a outra. Isso possivelmente ocorreu pelo fato dos sujeitos desse grupo passarem por mais períodos de privação de alimento e de água durante o protocolo de estressores. Quando ele foi finalizado,

o consumo de alimento para esse grupo apresenta os maiores valores em comparação aos demais grupos, considerando-se o consumo em linha de base como referência.

Para o Grupo Privação, quando então é iniciado o procedimento de privação de água (Semana 1), o consumo de alimento passa a apresentar valores muito próximos um do outro nas diferentes semanas (Semanas 1 a 6), o que dura até o fim das seis semanas em que o grupo é submetido à privação de água. O consumo de alimento do Grupo Privação, nessas semanas, fica um pouco maior que o consumo apresentado pelo Grupo Controle em todas as semanas. Terminado o procedimento de privação de água, o consumo de alimento desse grupo aumenta, o que possibilita inferir que a privação de água estava afetando o consumo de alimento de modo a reduzir esse consumo.

Relacionando o dado de variação no consumo de alimento considerando-se o consumo em linha de base (Figura 12) à variação no peso corporal (Figura 8), é possível observar que mesmo apresentando uma variação no consumo de alimento semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle, a variação no peso corporal do Grupo Privação é mais parecida com a do Grupo Protocolo. Pelo fato do consumo de alimento ser semelhante entre os Grupos Controle e Privação, poder-se-ia supor que o peso apresentasse a mesma semelhança. No entanto, ele apresenta semelhança com a variação de peso apresentada pelo Grupo Protocolo.

DISCUSSÃO

Foi proposta no presente estudo a submissão de sujeitos da linhagem *Wistar* a um protocolo de estressores idêntico ao utilizado por D'Aquila et al. (1997) (Grupo Protocolo) e apenas à privação de água presente nesse protocolo (Grupo Privação), realizando-se semanalmente testes de ingestão e preferência por sacarose, para avaliar os efeitos dessas variáveis (protocolo e privação de água) nessa medida, bem como no peso corporal e no consumo livre de alimento e água (conforme, por exemplo, Muscat & Willner, 1992; Thomaz, 2001, 2009). Era proposta a investigação sobre a privação ser ou não capaz de produzir as alterações encontradas no consumo pela submissão ao protocolo como um todo, além de qual seria a privação (água ou alimento) crítica para isso (por isso, o isolamento da privação apenas de água, e não de ambas ao mesmo tempo). Optou-se pelo isolamento apenas da privação de água, visto que Muscat e Willner (1992) avaliaram apenas a privação de alimento, e não produziram resultados que demonstravam ser esta uma variável crítica na produção de diminuição no consumo de sacarose. Mais ainda, pretendia-se com isso comparar os resultados com os encontrados por Hatcher et al. (1997), em que apenas a privação de alimento mostrou efeito, e a privação de água não (contrário ao encontrado por Muscat & Willner). Foi também proposto um Grupo Controle apenas submetido aos testes de ingestão e preferência por sacarose, para comparação do consumo desses sujeitos com os demais grupos.

Vale lembrar que no presente estudo foi utilizado o protocolo de estressores idêntico ao de D'Aquila et al. (1997), com o teste sendo realizado no período de escuro. Foi feita a opção por esse protocolo de estressores, e não o protocolo e o teste semelhantes ao de Willner et al. (1987), porque no estudo de 1997 foi utilizada a linhagem *Wistar* e o efeito de diminuição na preferência e ingestão de sacarose pelos sujeitos foi observado, diferente do que ocorreu em outros estudos com a mesma linhagem naquele laboratório em que o protocolo utilizado e o teste foram diferentes (conforme relato dos autores). Além disso, em outro estudo (Pereira & Sérió, 2010), a mesma linhagem foi utilizada e houve falha em encontrar efeitos utilizando-se o protocolo idêntico ao de Willner et al.

Serão aqui discutidos os resultados de ingestão e preferência por sacarose, bem como o peso corporal e sua relação com essa medida, com o consumo de alimento e água e com o protocolo de estressores e com a privação de água.

A ingestão média de sacarose apresentou queda para os três grupos no decorrer dos testes. Portanto, diferentemente do observado por D'Aquila et al., (1997), Willner et al., (1987), no presente estudo, o consumo de sacarose apresenta queda para o Grupo Controle

que não foi submetido a nenhum procedimento específico ao longo de todo o experimento (a não ser os testes de consumo e preferência semanais após privação de 23 horas de alimento e água). Ou seja, o Grupo Controle do presente estudo não replicou o padrão de consumo encontrado em estudos anteriores (e.g. D'Aquila et al., Willner et al.), em que comparativamente o consumo de sacarose permanece maior que o do grupo submetido ao protocolo. Dessa forma, não há como afirmar que a privação ou o protocolo, e não uma variável estranha, tenha sido responsável pela diminuição no consumo de sacarose encontrada para todos os grupos. O fato do Grupo Controle apresentar variações no consumo de sacarose e tendência de queda sem que nenhuma variável tenha sido deliberadamente aplicada a esse grupo levanta a questão sobre o que seria crítico para a produção de alterações nessa medida (já que ela parece ser sensível a alguma outra variável não deliberadamente aplicada aos sujeitos – por exemplo, alteração de temperatura, passagem do tempo, o próprio consumo de sacarose em semanas consecutivas, etc.). Portanto, mesmo encontrando semelhanças quanto ao consumo de sacarose entre os Grupos Protocolo e Privação, não há como afirmar que a privação de água tenha o mesmo efeito que o protocolo de estressores completo, visto que não estão claros nem quais seriam esses efeitos, no presente estudo.

Pode ser que um estudo em que a estabilidade no consumo e preferência por sacarose fosse garantida antes do início do protocolo garantisse que esse tipo de variabilidade apresentada pelo Grupo Controle do presente estudo não ocorresse. No entanto, como o próprio consumo de sacarose e a privação precedente ao teste podem ter efeitos cumulativos (conforme possibilidade levantada por Pereira, 2010, e estudo de Martin & Timofeeva, 2010), o número de testes necessário para a apresentação de um consumo de sacarose estável poderia ser muito alto, fazendo com que o consumo fosse afetado pela própria exposição repetida à sacarose e à privação. Nos demais estudos aqui citados (e.g. D'Aquila, et al., 1997; Muscat & Willner, 1992), foram realizados três ou quatro testes previamente ao protocolo. Nesses estudos os autores não falam a respeito de estabilidade no consumo como um critério para o número de testes, apenas citam o critério de divisão dos sujeitos pelos grupos de modo a equalizar o consumo entre eles após a linha de base. Ou seja, por ser a comparação entre os grupos crítica, e não a comparação com a linha de base, e a divisão dos grupos possibilitar uma média semelhante entre eles, pode ser que ou o consumo já apresente estabilidade, não precisando ser esta uma variável a ser considerada, ou a média do grupo "mascare" a instabilidade individual de um teste para outro. Como os dados de linha de base não são apresentados nos estudos, há dificuldade em se afirmar sobre uma coisa ou sobre a outra. Portanto, sugere-se que futuros estudos se proponham a investigar quantos testes poderiam ser

considerados o mínimo necessário para atingir estabilidade no consumo para, só então, iniciar o protocolo de estressores. Ainda, avaliar se a divisão dos sujeitos nos grupos pelo consumo apresentado em linha de base não possibilita uma “falsa” estabilidade/ equalização, dadas grandes diferenças individuais ou intersujeito comparando-se um teste a outro.

Uma alternativa seria estudar a concentração de sacarose que produz um consumo mais estável para essa linhagem. Mesmo realizando o procedimento de exposição à sacarose de 48 horas previamente ao teste, ao qual Hatcher et al. (1997) se referem como “treino de consumo de sacarose”, não há apresentação de consumo de sacarose a uma concentração de 2% estável no presente estudo. Pode ser que uma concentração mais alta do líquido produzisse um consumo menor e mais semelhante entre um teste e outro, fazendo com que os efeitos de “anedonia” se tornassem mais notáveis (e.g. Phillips, Willner & Muscat, 1991, em que concentrações intermediárias produziram consumo mais estável que concentrações altas e baixas). No estudo de D’Aquila et al. (1997), por exemplo, os valores médios de consumo de sacarose a cada teste ficaram entre 5 e 12 g, enquanto que tanto no estudo de Pereira e Sérgio (2010) quanto no presente estudo ficaram próximos a 20 g. O menor consumo no estudo de D’Aquila et al., que demonstrou o efeito de redução no consumo de sacarose pelo protocolo de estressores, reforça a hipótese de que valores mais baixos possivelmente produzem uma variação mais nítida no consumo quando da submissão ao protocolo. Portanto, se a alteração na concentração produzir como efeito um consumo menor e mais estável, é válido que um estudo se proponha a essa investigação.

Uma outra possibilidade seria a de previamente ao protocolo dividir os sujeitos em dois grupos, um que apresentasse o maior consumo de sacarose em linha de base e outro que apresentasse o menor consumo (Grupo Alto Consumo e Grupo Baixo Consumo). Então, metade de cada grupo passaria pelo protocolo, e a outra metade formaria o Grupo Controle. Dessa forma, haveria maior facilidade em se determinar os efeitos do protocolo sobre o consumo de sacarose, já que segundo Kanarik, Kõiv, Matrov e Harro (2009), sujeitos com maior consumo em linha de base demonstram mais claramente os efeitos de estressores do que sujeitos com menor consumo.

Além de ter sido observada ligeira queda no consumo de sacarose para o Grupo Controle, conforme colocado, o mesmo ocorreu tanto o Grupo Protocolo quanto para o Grupo Privação. Esse resultado é contrário ao encontrado por Pereira e Sérgio (2010), em que foi observado aumento na ingestão média ou manutenção dos valores de consumo durante todo o experimento para todos os sujeitos, inclusive durante o protocolo de estressores (tanto para os sujeitos submetidos ao protocolo completo quanto para os submetidos apenas às privações de

água e alimento do protocolo, ou ao protocolo sem as privações). Ou seja, no presente estudo, o consumo de sacarose foi sendo reduzido com o passar das semanas, enquanto no estudo de Pereira e Sérgio foi aumentando. Algumas possibilidades podem ser levantadas com relação a essa diferença. Em primeiro lugar, no estudo de Pereira e Sérgio, foram realizados 12 testes antes do início do protocolo ou da privação. Conforme já salientado, o próprio consumo de sacarose repetido poderia ser apontado como responsável pelo maior consumo posteriormente. Uma possibilidade seria a de estudar o consumo de sacarose em testes repetidos e em diferentes grupos, cada um sendo submetido a uma quantidade de testes diferentes, para investigar especificamente o efeito de testes precedentes no consumo em testes posteriores. Poderiam ser comparadas as quantidades consumidas no teste final entre os grupos, além do aumento no consumo de um teste para outro.

Outra possibilidade de explicação da diferença entre os resultados do presente estudo e de Pereira e Sérgio (2010) refere-se à privação e ao protocolo a que os sujeitos foram submetidos em cada estudo. No presente estudo, foi utilizado o protocolo de estressores idêntico a D'Aquila et al. (1997), enquanto em Pereira e Sérgio o protocolo era semelhante ao de Willner et al. (1987). Portanto, mesmo nos grupos submetidos apenas às privações do protocolo em cada estudo, a própria privação não é comparável, tanto por se tratarem de diferentes protocolos, quanto pelo fato de que Pereira e Sérgio realizaram as privações de alimento e água, enquanto no presente estudo foi realizada apenas a privação de água do protocolo para o Grupo Privação. Dessa forma, não se pode afirmar que a privação de água (como realizada aqui) produz menor consumo de sacarose, nem que ambas as privações (como realizado em Pereira & Sérgio) produzem maior consumo. Seria necessário que um estudo se dedicasse exclusivamente a investigar o papel da privação no consumo de sacarose, tanto isolando cada uma delas (apenas privando de alimento ou apenas de água), quanto aplicando ambas em conjunto. Mais ainda, que investigasse qual o efeito de diferentes períodos de privação (privações mais ou menos frequentes e de mais ou menos horas) no consumo de sacarose apresentado no teste semanal, para só então determinar se a privação (ou as privações), ou o protocolo de estressores, é que afeta o consumo de sacarose, especialmente pelo fato de que nos estudos do modelo CMS os protocolos (e as privações neles contidas) sempre diferem entre si.

Com relação ao peso corporal, foi encontrado no presente estudo que ambos, o protocolo de estressores e a privação de água a que os dois grupos correspondentes foram submetidos, produziram menor ganho de peso corporal enquanto estiveram em vigor, comparativamente ao Grupo Controle. Com a suspensão do protocolo e da privação, ambos os

grupos apresentaram maior ganho de peso que o Grupo Controle, tornando os pesos dos três grupos próximos novamente, principalmente a partir da segunda semana em que os procedimentos não estavam mais sendo aplicados. Também a partir da segunda semana sem o protocolo em vigor, o Grupo Protocolo passou a apresentar maior ganho de peso que o Grupo Privação. Pelo fato do peso corporal não ter sido levado em conta como critério para distribuição dos sujeitos em cada um dos grupos, ele acabou apresentando diferenças entre os grupos ainda na linha de base, quando o protocolo de estressores e a privação de água ainda não estavam em vigor. Em estudos posteriores, sugere-se que os sujeitos sejam distribuídos pelos grupos de modo a equalizar não somente o consumo de sacarose, mas também o peso corporal, para que a comparação da evolução de peso durante o protocolo com o peso apresentado em linha de base seja mais precisa.

Essa relação entre protocolo/ privação e menor peso já seria esperada, visto que períodos de ausência de alimento e água produzem menor ganho no peso corporal (e.g. Tomanari, Pine & Silva, 2003). Forbes et al. (1996), por exemplo, relatam que o grupo submetido apenas às privações do protocolo apresentou ganho de peso idêntico ao grupo submetido ao protocolo completo. No entanto, Hatcher et al. (1997) tiveram resultado diferente: não apenas a privação de alimento, mas apenas os demais estressores parecem ser responsáveis pelo menor ganho de peso, dado que o grupo submetido ao protocolo sem privação de alimento de seu estudo também teve redução de peso semelhante ao grupo submetido ao protocolo completo. Portanto, o papel da privação no protocolo (maneira como é aplicada, quantidade de privação, etc.) ainda merece investigação.

Um dado que vale ser destacado quanto aos ganhos de peso individuais observados refere-se ao fato de que os Sujeitos 1 e 4 do Grupo Protocolo não apresentam praticamente nenhum ganho de peso ao longo da submissão ao protocolo de estressores. Pode ser que esses sujeitos tenham influenciado a média do grupo de modo a mantê-la baixa durante a submissão ao protocolo, tornando a média menos representativa do que ocorreu para todos sujeitos desse grupo com relação ao ganho de peso ao longo das semanas de submissão ao protocolo de estressores. Outro ponto a ser destacado é que também para esses sujeitos, especialmente para o Sujeito 1, a ingestão de sacarose durante o protocolo de estressores apresentou queda em relação à linha de base, e após a suspensão do protocolo não houve retorno aos valores inicialmente consumidos. Ou seja, tanto os dados de ingestão de sacarose quanto os dados de peso corporal para esse sujeito “replicariam” o encontrado com os sujeitos dos estudos que reportam efeito de anedonia pela submissão ao protocolo de estressores (e.g. D’Aquila, et al., 1997; Muscat & Willner, 1992; Thomaz, 2001, 2009; Willner et al., 1987). No entanto, dois

pontos merecem destaque: (1) não há como afirmar que o efeito seja do protocolo completo, e não da privação de água, uma vez que variações no consumo semelhantes ocorreram com sujeitos do Grupo Pivação; (2) o fato do efeito ocorrer com apenas um dentre cinco sujeitos coloca em questão a validade do modelo como um bom modelo para estudo do fenômeno da depressão, ou pelo menos do consumo de sacarose como uma boa medida dos efeitos do protocolo. Esse ponto já fora levantado por Matthews et al. (1995), Forbes et al. (1996) e Hatcher et al. (1997). Nesses estudos, o fato do consumo de sacarose se mostrar dependente do status alimentar (sujeitos estarem ou não privados de água e alimento) permite aos autores argumentarem que o consumo de sacarose não é uma boa medida do estado hedônico, como é considerado por Willner et al., por exemplo. Por essa razão, D'Aquila et al. colocam que os longos e frequentes períodos de privação foram removidos do protocolo nos estudos realizados por seu grupo com o passar do tempo. No estudo de D'Aquila et al., mesmo com menores e menos frequentes períodos de privação, a redução no consumo de sacarose pela submissão ao protocolo ainda foi demonstrada, o que não ocorreu no presente estudo. O que os autores argumentam com relação aos estudos que encontraram redução no consumo de sacarose semelhante entre o grupo submetido ao protocolo completo e apenas à privação é de que possivelmente a aplicação da privação de maneira ocasional e imprevisível tenha funcionado como estressor, e por isso o efeito foi semelhante ao do protocolo completo. Portanto, o papel da privação no protocolo de estressores e sua relação com o consumo de sacarose ainda merece ser investigado. Mais ainda, sugere-se a investigação de quais seriam os fatores determinantes (imprevisibilidade, quantidade de tempo, entre outros) da maior sensibilidade na submissão ao protocolo de estressores, inclusive como uma forma de acessar a etiologia do transtorno depressivo induzido por estresse.

Também analisada no presente estudo foi a relação entre consumo de sacarose e peso corporal proposta por Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996). Segundo os autores, a privação seria suficiente para produzir resultados semelhantes ao protocolo como um todo pelo fato da alteração de peso produzida por essa variável ser a responsável pela redução na ingestão de sacarose. Para eles, o consumo de sacarose é proporcional ao peso dos sujeitos, e uma vez que o peso é reduzido (por conta da privação), o consumo de sacarose também diminui e, por isso, os resultados do protocolo simulariam erroneamente o efeito de anedonia conforme proposto por Willner et al. (1987). No presente estudo, no entanto, o consumo variou com tendência de queda para os três grupos, enquanto o peso variou com tendência de aumento para os três grupos. Dessa forma, a afirmação de que o consumo varia proporcionalmente ao peso não pode ser feita no presente estudo. Mais ainda, pelo fato de não

haver diferenças entre os grupos pode-se afirmar também que alguma outra variável, e não a privação (isoladamente ou em conjunto com os demais estressores) é que altera o consumo de sacarose apresentado pelos sujeitos.

Willner, Moreau, Nielsen, Papp e Sluzewska (1996) comparam os resultados dos estudos realizados por seu grupo (e.g. Muscar & Willner, 1992) com os de Matthews et al. (1995) e colocam que enquanto os sujeitos de seus estudos perdem no máximo 10,2% de seu peso corporal após três semanas de submissão ao protocolo de estressores, no estudo de Matthews et al. essa perda chega a ser superior a 20% dado o mesmo período. Então, a perda de peso apresentada pelos sujeitos do estudo de Matthews et al. seria muito superior à perda apresentada pelos sujeitos do estudo de Willner et al. A maior perda de peso faria com que a proporção entre consumo de sacarose e peso se mantivesse inalterada de um teste para outro, no caso do estudo de Matthews et al., o que não ocorre nos estudos do grupo de Willner (assim como no estudo de Hatcher et al., 1997, por exemplo). A mesma comparação pode ser feita com os dados do presente estudo: a variação no peso durante todo o experimento foi de ganho máximo de 13,9% para o Grupo Controle, 13,4% para o Grupo Protocolo, e de 13% para o Grupo Pivação, comparando-se o início dos testes com o peso final, enquanto que comparando-se com o último teste de linha de base, foram observadas quedas no consumo de sacarose de até 24,5%, 32,7% e 26,5%, respectivamente, para os três grupos.

Dessa forma, também ocorre que no presente estudo o consumo de sacarose não acompanha (não é proporcional a, não covaria com) a variação de peso corporal, diferente do sugerido por Matthews et al. (1995) e Forbes et al. (1996). Mesmo utilizando uma linhagem diferente da utilizada no presente estudo, o que poderia ocasionar valores de consumo de sacarose diferentes e, dessa forma, consumo relativo ao peso maior ou menor, as variações encontradas naquele estudo (pela inspeção gráfica dos resultados) foram de aproximadamente 25% no consumo de sacarose, e os grupos do presente estudo apresentaram variações de aproximadamente 30%. Ou seja, mesmo diferindo em valores absolutos, os dois estudos se aproximam em termos da amplitude de variação. Portanto, é possível afirmar que quanto ao consumo relativo ao peso, não foi encontrada a relação sugerida por Matthews et al. e Forbes et al. no presente estudo.

Mesmo não sendo possível afirmar que o protocolo de estressores ou a privação de água produziram redução na ingestão de sacarose, dado que o mesmo ocorreu com o Grupo Controle, nem quanto à relação entre o consumo de sacarose e o peso corporal dos sujeitos, observou-se no presente estudo que o ganho de peso ao longo das semanas diferiu entre os grupos de sujeitos. Procedeu-se, então, à análise do consumo de alimento e água ao longo do

experimento para os três grupos, uma vez que essa ingestão é sabida afetar a evolução de peso corporal (e.g. Tomanari, Pine & Silva, 2003).

Foi observado com relação ao consumo de alimento que os três grupos apresentaram diminuição com o passar do tempo. Ou seja, comparando-se o consumo apresentado em linha de base com o consumo nas semanas seguintes, tem-se uma queda sistemática no consumo de alimento de uma semana para a outra, até o final do experimento. Comparando-se o consumo de alimento do final do experimento com o consumo inicial, essa queda é menor para o Grupo Protocolo que para os demais grupos. Conforme salientado nos resultados, o consumo de alimento foi mais estável para os Grupos Privação e Controle, em comparação ao Grupo Protocolo. Ou seja, o consumo apresentou maior regularidade (valores parecidos) entre as semanas para os Grupos Privação e Controle do que para o Grupo Protocolo, que apresentou as maiores quedas no consumo de alimento em duas das semanas de protocolo de estressores.

Um dado interessante foi que comparando-se o consumo de alimento durante o protocolo ou a privação com o apresentado em linha de base, observou-se que o consumo foi maior para o Grupo Protocolo em comparação ao Grupo Privação em duas semanas durante o protocolo. Ou seja, mesmo com menos tempo de acesso ao alimento, dado que o protocolo incluía períodos de privação desse item, o Grupo Protocolo consumiu mais alimento em duas dessas semanas que o Grupo Privação (apenas privado de água). Isso quer dizer que nos momentos em que o alimento esteve disponível, os sujeitos desse grupo consumiram uma quantidade suficiente para igualar (ou ultrapassar) o consumo ao que ele seria caso o alimento estivesse livre o tempo todo. Além disso, relacionando o dado de variação no consumo de alimento considerando-se o consumo em linha de base (Figura 12) à variação no peso corporal (Figura 8), é possível observar que mesmo apresentando uma variação no consumo de alimento semelhante ao apresentado pelo Grupo Controle, a variação no peso corporal do Grupo Privação é mais parecida com a do Grupo Protocolo. Pelo fato do consumo de alimento ser semelhante entre os Grupos Controle e Privação, poder-se-ia supor que o peso apresentasse a mesma semelhança. No entanto, ele apresenta semelhança com a variação de peso apresentada pelo Grupo Protocolo.

Portanto, não se pode dizer que a perda de peso sofrida pelos dois grupos é reflexo direto do menor consumo desses itens apresentado durante os procedimentos aos quais foram submetidos. O que é possível afirmar é que a privação (tanto de alimento e água, o que ocorreu para o Grupo Protocolo, quanto apenas de água, o que ocorreu para o Grupo Privação) faz com que os sujeitos consumam mais alimento, dada a comparação entre o Grupo Controle e os Grupos Protocolo e Privação. Mesmo assim, esse maior consumo não

“compensa” o período sem consumir (período de restrição) com relação ao peso corporal. Ou seja, mesmo consumindo uma quantidade de alimento maior em determinadas semanas, o Grupo Protocolo apresenta maior queda de peso que os demais grupos, seguido pelo Grupo Privação e, somente então, pelo Grupo Controle.

Uma hipótese que pode ser levantada é a de que a quantidade de alimento consumida não seja a única variável responsável por variações no peso corporal. Ou seja, não apenas a quantidade, mas também o tempo e a periodicidade de alimentação interferem com o ganho ou perda de peso. Dessa forma, mesmo consumindo semanalmente a mesma quantidade ou quantidade inclusive maior que o Grupo Controle, o tempo de alimentação e os intervalos entre alimentações poderia ter sido responsável pelo efeito encontrado no peso dos sujeitos do Grupo Protocolo.

Outra possibilidade é a de que os demais estressores do protocolo tenham tido efeito no peso corporal. Dessa forma, mesmo consumindo uma quantidade de alimento semelhante ou superior semanalmente, os sujeitos do Grupo Protocolo não ganharam a mesma quantidade de peso por estarem sob efeito dos demais estressores. No entanto, essa afirmação só poderia ser feita se o efeito fosse diretamente testado: um grupo de sujeitos fosse submetido aos demais estressores do protocolo, exceto as privações de alimento e água, e a evolução de peso desses sujeitos fosse comparada a um grupo controle, não submetido a nenhum estressor. Portanto, sugere-se a realização de um estudo como esse para que a hipótese aqui proposta seja testada.

De qualquer forma, esse resultado permite duas sugestões: (a) outras medidas (peso, por exemplo), poderiam ser mais indicativas de efeitos do protocolo de estressores do que a medida de consumo de sacarose; (b) quais seriam os aspectos do protocolo de estressores (ou da privação, ou dos demais estímulos sem a privação) responsáveis pelos efeitos produzidos por ele.

Quanto à (a), também outras medidas já foram apontadas como mais sensíveis e fidedignas dos efeitos do protocolo de estressores que a medida de ingestão e preferência por sacarose. Rocha (2013), por exemplo, realizou um experimento em que submeteu os sujeitos de um grupo aos testes de ingestão e preferência por sacarose e ao protocolo de estressores, além de um grupo controle apenas submetido aos testes. Posteriormente ao protocolo, ambos os grupos passaram por um procedimento de treino de uma discriminação simples (luz como condição Sd e escuro como condição SΔ). Como resultados do estudo observou-se que não houve redução no consumo de sacarose durante o protocolo para o grupo submetido a ele (pelo contrário, houve aumento nesse consumo), assim como ocorreu com o grupo controle.

No entanto, no treino discriminativo realizado após a submissão ao protocolo, observou-se que sujeitos que passaram por essa condição demoraram pelo menos o dobro do tempo de sujeitos do grupo controle para atingirem o critério discriminativo, e ainda tiveram desempenho pior no teste de generalização. Ou seja, assim como no presente estudo, na medida de ingestão e preferência por sacarose, não foram observados efeitos do protocolo de estressores; em uma outra medida, esses efeitos foram demonstrados. Portanto, questiona-se aqui a confiabilidade do consumo de sacarose como uma medida dos efeitos do protocolo de estressores, uma vez que não é observada sistematicamente variação na mesma quando da submissão ao protocolo (e.g., Pereira & Sérgio, 2010; Rocha; o presente estudo), e a preferência pelo uso de outras medidas (peso corporal, desempenho em uma condição de aprendizagem, etc.).

Outro ponto refere-se aos critérios de validade do modelo CMS como um modelo animal de depressão. O fato dos sujeitos apresentarem usualmente redução no consumo de sacarose levou os autores da área a interpretar esse efeito como anedonia (redução na sensibilidade a estímulos usualmente prazerosos), o que atestaria o modelo como válido com relação ao transtorno depressivo maior (e.g., Monleon et al., 1991; Sampson, Willner & Muscat, 1991; Willner et al., 1987). No entanto, a ausência desse efeito poderia questionar o critério de validade aparente. Porém, outro critério diagnóstico do transtorno depressivo maior é a “perda de peso significativa sem estar fazendo dieta” (DSM-V, 2014, p. 8, Transtornos Depressivos I). Dados os resultados do presente estudo, em que o consumo de alimento não reduz para os sujeitos submetidos ao protocolo e à privação, mas há redução no peso, poder-se-ia inferir que o modelo apresenta validade aparente, mas com relação à outra medida, que não a de consumo de sacarose. A isso soma-se o fato de que em estudos que testaram medicamentos (e.g. Cheeta, Broekkamp & Willner, 1994; Papp, Moryl & Willner, 1996; Sampson, Willner & Muscat, 1994), a validade farmacológica também foi demonstrada. No entanto, pelo fato da privação de água ter produzido efeito semelhante é colocado que não o protocolo como um todo, mas apenas essa variável, é necessária e suficiente para a produção do efeito.

Isso leva à questão (b) de que aspecto dessa manipulação seria crítico para a produção dos efeitos encontrados. Thomaz (2001, 2009), por exemplo, coloca a questão da incontrolabilidade como crítica para os efeitos do protocolo de estressores. Em seus estudos, os efeitos de redução no consumo e preferência por sacarose foram revertidos pela exposição dos sujeitos às condições operantes de produção de reforçador pela resposta operante de pressão à barra. Uma semelhança apresentada entre a privação de água e o protocolo de

estressores é que ambos representam uma situação na qual o sujeito não pode produzir alterações em seu ambiente, sendo sujeito à elas não importa o que faça. Essa semelhança poderia ser responsável pela semelhança encontrada entre os resultados dos dois grupos.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. DSM-V: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Broekkamp, C. (1997). Predictive validity and the robustness criterion for animal models. *Psychopharmacology*, 134, 341–343. doi: 10.1007/s002130050461.
- Cardoso, L. R. D. (2008). *Efeitos do esquema de intervalo variável na preferência e no consumo de líquidos apresentados por ratos submetidos ao chronic mild stress*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Cheeta, S., Broekkamp, C., & Willner, P. (1994). Stereospecific reversal of stress-induced anhedonia by mianserin and its (+)-enantiomer. *Psychopharmacology*, 116, 523–528. doi: 10.1007/BF02247488.
- Cheeta, S., Ruigt, G., van Proosdij, J., & Willner, P. (1997). Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biological psychiatry*, 41, 419–427. doi:10.1016/S0006-3223(96)00058-3.
- D'Aquila, P. S., Brain, P., & Willner, P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & behavior*, 56, 861–867. doi:10.1016/0031-9384(94)90316-6.
- D'Aquila, P. S., Newton, J., & Willner, P. (1997). Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiology & Behavior*, 62(2), 421–426. doi:10.1016/S0031-9384(97)00042-5.
- Dias, Á. M. (2009). A depressão em humanos e outras espécies. *Estudos e pesquisas em psicologia*, 9, 582–595. Retirado de: <http://www.revispsi.uerj.br/v9n3/artigos/pdf/v9n3a03.pdf>.
- Dolabela, A. C. F. O. (2004). *Um estudo sobre as possíveis interações entre o Chronic Mild Stress e o desempenho operante*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K., & Reid, I. A. N. C. (1996). Chronic Mild Stress and Sucrose Consumption: Validity as a Model of Depression. *Physiology & Behavior*, 60, 1481–1484. doi: 10.1016/S0031-9384(96)00305-8.
- Hatcher, J. P., Bell, D. J., Reed, T. J., & Hagan, J. J. (1997). Chronic mild stress-induced reductions in saccharin intake depend upon feeding status. *Journal of Psychopharmacology*, 11(4), 331–338. doi:10.1177/026988119701100408.
- Kanarik, M., Kõiv, K., Matrov, D. & Harro, J. (2009). Response to chronic social stress in the rat depends on persistent differences in sucrose consumption. *European Neuropsychopharmacology*, 19, 139–140. doi: 10.1016/S0924-977X(09)70148-8.
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2011). Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Current Topics in Behavioral Neuroscience*, 7, 121–147. doi:10.1007/7854.
- Martin, J. & Timofeeva, E. (2010). Intermittent access to sucrose increases sucrose-licking activity and attenuates restraint stress-induced activation of the lateral septum. *American Journal of Physiology*, 298, 1383-1398. doi: 10.1152/ajpregu.00371.2009.
- Matthews, K., Christmas, D., Swan, J., & Sorrell, E. (2005). Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29, 503–513. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.03.005.
- Matthews, K., Forbes, N., Reid, C. (1995). Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Psychology & Behavior*, 57, 241-248. doi:10.1016/0031-9384(94)00286-E.
- Monleon, S., D'Aquila, P., Parra, A., Simon, V. M., Brain, P. F., & Willner, P. (1995). Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, 117, 453–457. doi: 10.1007/BF02246218.
- Moreau, J., Jenck, F., Martin, J., Mortas, P. & Haefely, W. (1992). Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 2, 43–49. doi: 10.1016/0924-977X(92)90035-7.

- Muscat, R., Papp, M., & Willner, P. (1992). Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. *Biological psychiatry*, 31, 937–946. doi:10.1016/0006-3223(92)90119-K.
- Muscat, R., Sampson, D., & Willner, P. (1990). Dopaminergic mechanism of imipramine action in an animal model of depression. *Biological psychiatry*, 28, 223–230. doi:10.1016/0006-3223(90)90577-O.
- Muscat, R., Towell, A., & Willner, P. (1988). Changes in dopamine autoreceptor sensitivity in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, 94, 545–550. doi: 10.1007/BF00212853.
- Muscat, R., Willner, P. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16, 507–517. doi:10.1016/S0149-7634(05)80192-7.
- Papp, M., Moryl, E., & Willner, P. (1996). Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *European journal of pharmacology*, 296, 129–136. doi:10.1016/0014-2999(95)00697-4.
- Papp, M., Willner, P., Muscat, R., & Street, O. C. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology*, 104, 255–259. doi: 10.1007/BF02244188.
- Pereira, C. & Sérgio, T. (2010). *Chronic Mild Stress*: um estudo sobre a interação entre submissão ao protocolo de estressores, comportamento operante e privação. *Revista Brasileira de Análise do Comportamento*, 6, 67–88. Retirado de: <http://www.periodicos.ufpa.br/index.php/rebac/article/view/994/1436>.
- Phillips, G., Willner, P., & Muscat, R. (1991). Suppression or facilitation of operant behaviour by raclopride dependent on concentration of sucrose reward. *Psychopharmacology*, 105, 239–246. doi: 10.1007/BF02244316.

- Reid, I., Forbes, N., Stewart, C. & Matthews, K. (1997). Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model? *Psychopharmacology*, 134, 365-367. doi: 10.1007/s002130050471.
- Rocha, L. (2013). *Os efeitos da submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) no estabelecimento de uma discriminação*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Rodrigues, M. B. (2005). *Interações entre o Chronic Mild Stress e o Desempenho Operante: um Replicação de Dolabela (2004)*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Sampson, D., Willner, P., & Muscat, R. (1991). Reversal of antidepressant action by dopamine antagonists in an animal model of depression. *Psychopharmacology*, 104, 491–495. doi: 10.1007/BF02245655.
- Thomaz, C. R. C. (2001). *O Efeito da Submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) sobre o Valor Reforçador do Estimulo*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Thomaz, C. R. C. (2009). *Possíveis inter-relações entre a submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) e o desempenho operante*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Tomanari, G., Pine, A., & Silva, M. (2003). Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 5, 57-71. Retirado de: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-55452003000100007&lng=pt&tlng=pt.
- Weiss, J. M. (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology*, 134, 368–370. doi: 10.1007/s002130050472.
- Willner, P. (1991). Animal models as simulations of depression. *Trends in pharmacological sciences*, 12, 131–136. doi:10.1016/0165-6147(91)90529-2.

- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, 319–329. doi: 10.1007/s002130050456.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52, 90–110. doi:10.1159/000087097.
- Willner, P., Lappas, S., Cheeta, S., & Muscat, R. (1994). Reversal of stress-induced anhedonia by the dopamine receptor agonist, pramipexole. *Psychopharmacology*, 115, 454–462. doi: 10.1007/BF02245568.
- Willner, P., Moreau, J. L., Nielsen, C. K., Papp, M., & Sluzewska, A. (1996). Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiology & behavior*, 60, 129–134. Retirado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804652>.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93, 358–364. doi: 10.1007/BF00187257.