## Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia

# Modelagem Estocástica do Labirinto em Cruz Elevado

Rafael Arantes

Ribeirão Preto - SP 2016

## RAFAEL ARANTES

## Modelagem Estocástica do Labirinto em Cruz Elevado

## versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração:** Física Aplicada à Medicina e Biologia

**Orientador:** Antônio Carlos Roque

Ribeirão Preto - SP 2016 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Arantes, Rafael.

Modelagem Estocástica do Labirinto em Cruz Elevado/ Rafael Arantes; orientador Antônio Carlos Roque. Ribeirão Preto, 2016. 133 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Cadeias de Markov. 2. Comportamento. 3. Ansiedade. 4. Labirinto em Cruz Elevado.

Nome: ARANTES, Rafael Título: Modelagem Estocástica do Labirinto em Cruz Elevado

> Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:\_\_\_\_/\_\_\_\_.

# Banca Examinadora

Prof. Dr. :	 Instituição:	
Julgamento:	 Assinatura:	
Prof. Dr. : Julgamento:	 Instituição: Assinatura:	

iv

## AGRADECIMENTOS

À equipe do laboratório de comportamento exploratório da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial ao seu coordenador professor doutor Sílvio Morato pelos dados gentilmente cedidos.

Aos colegas de laboratório, em especial Dr. Héctor Julian Tejada que produziu os trabalhos que inspiraram esta tese, pelo apoio, discussões e ideias.

Ao meu orientador professor doutor Antônio Carlos Roque e coorientadora professora doutora Geraldine Góes Bosco por toda a ajuda.

À toda a equipe da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, assim como de toda a Universidade de São Paulo, por todo o apoio técnico.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio nessa caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. vi

# RESUMO

ARANTES, R. Modelagem Estocástica do Labirinto em Cruz Elevado.
133 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O labirinto em cruz elevado é muito usado em estudos relacionados à ansiedade em ratos. As medidas tradicionalmente usadas são o número de entradas e o tempo passado nos braços abertos. Trabalhos recentes analisam a movimentação no interior dos braços, mas não propõem um índice que resuma as análises feitas. Esta tese sintetiza as informações de um destes trabalhos em índices. Um dos índices propostos usa os tempos médios de primeira visita a cada posição do labirinto e o outro se baseia na distribuição estacionária de probabilidade, o primeiro é capaz de diferenciar grupos de ratos submetidos a diferentes drogas ansiolíticas. Além disso, a tese propõe um modelo de processo Markoviano que incorpora informações desconsideradas no modelo anterior. A comparação entre os modelos revelou valores super ou subestimados no primeiro. Por fim, esta tese propõe um modelo de cadeias de Markov considerando como estados o seguinte conjunto de comportamentos: *rearing, stretching, dipping, freezing e grooming.* Tal abordagem inédita, apesar de simplificar exageradamente o modelo, foi capaz de reproduzir várias características conhecidas da exploração.

**Palavras-chave:** 1. Cadeias de Markov. 2. Comportamento. 3. Ansiedade. 4. Labirinto em Cruz Elevado.

viii

## ABSTRACT

ARANTES, R. Elevated Plus Maze: a Stochastic Modeling. 133 p. Thesis (Ph.D.) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The elevated plus maze is widely used in studies related to anxiety in rats. The most widely used measures are the amount of entries and time spent on open arms. Recent studies analyze the movement inside the arms, but do not propose an index that summarizes the analyzes. This thesis summarizes by indices the information in one of these studies. An index uses the first visit average time to each position of the maze and another is based on the stationary probability distribution, the first one are able to differentiate groups of rats submitted to different anxiolytic drugs. These thesis also proposes a Markov process model that incorporates more information than the other model. The comparison between the models showed overor underestimated values in the first. Finally, this thesis proposes a Markov chains model considering the following behaviors as states: rearing, stretching, dipping, freezing and grooming. This new approach, though oversimplify the model was able to reproduce several known features of exploitation.

Key-words: 1. Markov Chain. 2. Behavior. 3. Anxity. 4. Elevated Plus-Maze.

х

# LISTA DE FIGURAS

1.1	Labirinto em cruz elevado	6
1.2	Representação em grafo do LCE	16
2.1	LCE como cadeia de Markov sem fuga	30
2.2	Matriz de transições	31
2.3	Matriz de transições do CDP	35
2.4	Matriz de transições do MDZ	35
2.5	Matriz de transições do grupo ansiolítico	36
2.6	Matriz de transições do grupo controle	36
2.7	Matriz de transições do grupo ansiogênico	37
2.8	Matriz de transições do SCZ	37
2.9	Matriz de transições do PTZ	38
2.10	Matriz de transições do PTZ10	38
2.11	Matriz de transições do PTZ20	39
2.12	Matriz de transições do PTZ30	39
2.13	Distribuição de probabilidades estacionária	41
2.14	$\pi$ 's dos ansiogênicos	41
2.15	$\pi$ 's dos ansiolíticos	42

2.16	Diferença de $\pi$ 's vizinhos próximos do centro	43
2.17	$\pi_6 - \pi_5 \ldots \ldots$	44
2.18	$\pi_6 - \pi_5$ para ansiolíticos	45
2.19	$\pi_6 - \pi_5$ para ansiogênicos	45
2.20	Tempo médio de primeira visita	47
2.21	Tempo médio de primeira visita dos ansiogênicos	47
2.22	Tempo médio de primeira visita dos ansiolíticos	48
2.23	Razão dos tempos médios	51
2.24	Razão dos tempos médios dos ansiolíticos	51
2.25	Razão dos tempos médios dos ansiogênicos	52
2.26	Razão dos tempos médios próximos ao centro	53
2.27	Razão dos tempos médios próximos ao centro dos ansiolíticos	54
2.28	Razão dos tempos médios próximos ao centro dos ansiogênicos . $\ldots$	54
3.1	Matriz de taxas do grupo ansiolítico	61
3.2	Matriz de taxas do grupo controle	61
3.3	Matriz de taxas do grupo ansiogênico	62
3.4	Taxas de saída de cada estado	64
3.5	Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga	66
3.6	$\pi$ dos grupos CDP, controle e PTZ30	68
3.7	$\mu$ dos grupos CDP, controle e PTZ30	70
4.1	Modelo etológico de cadeia de Markov	76
4.2	Matriz de transições etológica do CDP	76
4.3	Matriz de transições etológica do MDZ	77

4.4	Matriz de transições etológica do grupo controle
4.5	Matriz de transições etológica do SCZ
4.6	Matriz de transições etológica do PTZ
B.1	LCE como cadeia de Markov com fuga
B.2	Matriz de transições do CDP com fuga
B.3	Matriz de transições do grupo ansiolítico com fuga
B.4	Razão dos tempos médios dos ansiolíticos com fuga
B.5	Razão dos tempos médios próximos ao centro dos ansiolíticos com fuga116
B.6	$\pi_6 - \pi_5 \operatorname{com} \operatorname{fuga} \ldots \ldots$
B.7	$\pi_6 - \pi_5$ para ansiolíticos com fuga

xiv

# LISTA DE TABELAS

2.1	Quantidade de ratos e dosagem de drogas em cada grupo experimental.	29
3.1	Taxas de saída de cada estado	63
3.2	Tempos médios de permanência em cada estado	65
3.3	Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga	67
3.4	$\mu$ e $\pi$ dos grupos CDP, controle e PTZ30 $\hdots$ $\hdots$	69
4.1	Ratos que apresentam outros comportamentos registrados	74
4.2	Tempos médios de primeira visita do grupo CDP	78
4.3	Tempos médios de primeira visita do grupo PTZ30	79
4.4	Tempos médios de primeira visita do grupo controle	79
4.5	Tempos médios partindo dos estados $stretching,\ dipping$ e $\ grooming$ .	80
4.6	Probabilidade estacionária	82

xvi

# LISTA DE ABREVIATURAS

LCE	Labirinto em	Cruz Elevado.

RNA Rede Neural Artificial.

т 1 • • •

- CDP Clordiazepox (uma droga ansiolítica), também utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com essa droga.
- MDZ Midazolam (uma droga ansiolítica), também utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com essa droga.
- SCZ Semicarbazida (uma droga ansiogênica), também utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com essa droga.
- PTZPentilenotetrazol (uma droga ansiogênica), também utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com essa droga.
- PTZ10 Utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com 10mq/Kq da droga PTZ.
- PTZ20 Utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com 20mg/Kg da droga PTZ.
- PTZ30 Utilizado para identificar o grupo de ratos tratados com 30mg/Kg da droga PTZ.

xviii

# SUMÁRIO

Li	sta d	le Figu	iras		х	i
$\mathbf{Li}$	Lista de Tabelas				x۱	7
Li	sta d	le Abro	eviaturas		xvi	i
1	$\operatorname{Intr}$	oduçã	0		Ę	5
	1.1	Revisã	io Bibliog	ráfica	. (	5
		1.1.1	Caracter	ização por análise fatorial	. (	)
		1.1.2	Modelos	do comportamento de roedores no LCE baseados em		
			redes net	ırais artificiais	. 1(	)
			1.1.2.1	O modelo de Salum, Morato e Roque	. 10	)
			1.1.2.2	O modelo de Costa, Roque, Morato e Tinós $\ .\ .\ .$	. 12	2
		1.1.3	Modelos	probabilísticos	. 14	1
			1.1.3.1	O modelo de Giddings	. 14	1
			1.1.3.2	Caracterização por teoria dos grafos	. 15	5
			1.1.3.3	O modelo de Tejada, Bosco, Morato e Roque	. 18	3
	1.2	Motiva	ação, Obje	etivos e Estrutura da Tese	. 19	)

## 2 Modelagem a Tempo Discreto

 $\mathbf{23}$ 

	2.1	Cadeias de Markov a Tempo Discreto	23
	2.2	Materiais e Amostras	28
		2.2.1 Sujeitos	28
		2.2.2 Protocolo	29
	2.3	Construção do Modelo	30
	2.4	Resultados e Discussão	34
		2.4.1 Distribuição de Probabilidade Estacionária	40
		2.4.2 Tempos Médios de Primeira Visita	46
		2.4.2.1 Índice de Ansiedade Proposto	49
3	Mo	delagem a Tempo Contínuo	55
	3.1	Processo de Poisson e Processo Markoviano a Tempo Contínuo	56
	3.2	Construção do Modelo	59
	3.3	Resultados e Discussão	61
4	Aná	álise Etológica: uma modelagem a tempo discreto	73
	4.1	Materiais e Métodos	73
		4.1.1 Sujeitos	73
		4.1.2 Comportamentos	74
		4.1.3 Modelo	75
	4.2	Resultados	75
		4.2.1 Matrizes Estocásticas	75
		4.2.2 Tempos Médios de Primeira Visita	78
		4.2.3 Distribuição de Probabilidade Estacionária	81

5	Discussão e Conclusão	85
R	eferências Bibliográficas	95
$\mathbf{A}$	Conceitos de probabilidade	103
	A.1 Conceitos Teóricos	103
	A.2 Variável Aleatória	105
	A.3 Inferência em Processos Estocásticos	108
в	Modelo Discreto com Fuga	111
	B.1 Construção do Modelo	111
	B.2 Resultados do Modelo	112

3

# Capítulo 1

# INTRODUÇÃO

Na medicina, na farmacologia e na psicologia, a análise do comportamento exploratório de roedores em labirintos ou arenas específicas é usada para caracterizar novas drogas. Esse é o caso dos experimentos em que roedores são testados no chamado labirinto em cruz elevado (LCE). Nesse tipo de labirinto são realizados testes sobre o nível de ansiedade do roedor após diversos tipos de manipulações, tais como a aplicação de drogas, procedimentos cirúrgicos, entre outros.

O presente trabalho pretende estudar o teste no LCE do ponto de vista de modelos matemáticos, visando uma possível aplicação na área farmacológica. Para uma melhor compreensão do teste e o conhecimento do que já foi feito nesta área, a seção seguinte apresenta uma revisão bibliográfica sobre o LCE, a qual constitui uma adaptação daquela publicada no decorrer deste doutorado em Arantes et al. (2013a). Após a revisão, a seção 1.2 explicará em mais detalhes os objetivos específicos do trabalho e sua estrutura.

### 1.1 Revisão Bibliográfica

O LCE é um teste largamente utilizado para estudar comportamentos relacionados à ansiedade em ratos e camundongos, e o efeito de diferentes drogas sobre o comportamento do animal (HANDLEY; MITHANI, 1984; SALUM; MORATO; SILVA, 2000; WALF; FRYE, 2007; PAWLAK et al., 2012). O teste do LCE foi validado como um teste de ansiedade por uma grande quantidade de estudos (PELLOW



Figura 1.1: Representação esquemática do labirinto em cruz elevado. Ele consiste de uma plataforma em formato de cruz com quatro braços de iguais dimensões. Dois destes braços são cercados por paredes e dois são abertos. Essa plataforma fica uma distância acima do chão de cerca de 50*cm*.

et al., 1985; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; HOGG, 1996; GRIEBEL et al., 1997). Ele também é utilizado em vários outros estudos envolvendo aprendizado, memória e dependência química (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). No início de 2016 haviam 6038 trabalhos publicados no PubMed e 15287 no Science Direct reportando o uso do LCE.

O LCE (mostrado na figura 1.1) consiste de um labirinto em formato de cruz com 4 braços de tamanhos iguais. Dois desses braços, opostos entre si, são cercados por paredes, chamados braços fechados; os outros dois não possuem paredes e são chamados de braços abertos. Este aparato fica elevado a 50 centímetros do chão. O teste do LCE é popular porque é fácil de usar e não requer que o animal seja submetido a nenhum tipo de privação nem treinamento. Isso permite a observação direta dos efeitos de drogas que afetam a ansiedade (HOGG, 1996; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O LCE foi originalmente proposto por Pellow et al. (1985) baseado em uma ideia anterior de Montgomery (1955) de que a exploração de um novo ambiente gera no roedor um conflito entre o desejo de conhecer o novo ambiente e o de manterse protegido. A lógica por trás desse teste é que roedores têm aversão por espaços abertos desprotegidos que conflita com a sua tendencia em explorar novos ambientes. O comportamento do animal no LCE pode ser afetado por diferentes variáveis, dentre as mais citadas estão o nível de iluminação, sexo, idade, espécie, cepa, condições da gaiola e do laboratório (HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; RODGERS et al., 1999; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2005). Outras variáveis importantes são as relacionadas com a condição anterior do animal, como manipulações anteriores, estresse ou conhecimento prévio do labirinto, e aquelas relacionadas aos efeitos da droga (HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; SILVA; BRANDÃO, 2000).

O padrão de exploração de um animal no LCE é normalmente caracterizado por um conjunto de medidas relacionadas com o número de entradas e o tempo gasto nos dois tipos de braços. As medidas que capturam a ansiedade dos roedores mais usadas na literatura são: a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e a porcentagem de entradas nos mesmos. Tais porcentagens são calculadas com relação ao tempo gasto ou ao número de entradas em ambos os tipos de braços, e não à duração total do teste (FILE, 2001).

A atividade locomotora e os comportamentos de verificação de risco também são estudados. A medida da atividade locomotora inicialmente proposta foi o total de entradas nos braços (PELLOW et al., 1985). Contudo estudos de análise fatorial mostraram que um índice mais apropriado para isso é o número de entradas nos braços fechados (FILE, 2001).

Comportamentos de verificação de risco tem um papel histórico na definição do LCE como teste para ansiedade causada pela novidade, pois o LCE representa uma ameaça para o animal, o que induz esse tipo de comportamento. Outros testes de ansiedade que colocam o animal em contato com situações mais ameaçadoras, como a presença de um predador ou o seu cheiro, podem provocar respostas diferentes como comportamentos defensivos. Enquanto comportamentos de verificação de risco estão mais relacionados com ansiedade, comportamentos defensivos são mais relacionados com medo (RODGERS; DALVI, 1997; MOBBS et al., 2007). Uma das características mais importantes deste último é a possibilidade do animal escapar, o que é raro de se observar no LCE sob condições controladas. Por outro lado, o animal é mais frequentemente observado explorando cautelosamente algumas áreas, como a área central do labirinto. No LCE os comportamentos de verificação de risco relacionados com exploração cautelosa são levantar-se sobre as patas traseiras (*rearing*), se esticar para a frente sem mover as patas de trás (*stretching*), colocar a cabeça para fora e para baixo nos braços abertos (*dipping*), chegar ao final do braço aberto e permanecer tenso e estático (*freezing*) (HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; SILVA; BRANDÃO, 2000; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Outros comportamentos e medidas que tem sido reportadas no LCE são cheirar, se limpar (*grooming*) e a quantidade de fezes (SETEM et al., 1999; WALL; MESSIER, 2000; OHL, 2003).

Há muitas dimensões que possivelmente caracterizam o estado de ansiedade de um animal no LCE, envolvendo todas as variáveis espaço-temporais e etológicas que foram mencionadas até aqui. Porém, estudos de análise fatorial, realizados no final dos anos 90 e início dos anos 2000, mostram que modelos baseados em dois ou três fatores podem ser suficientes para explicar o comportamento relacionado à ansiedade de roedores no LCE (WALL; MESSIER, 2000). Em geral, cada um desses fatores é fortemente correlacionado (positivamente ou negativamente) com uma ou mais medidas espaço-temporais usadas para caracterizar o comportamento do roedor, isto é, porcentagem ou número de entradas nos braços abertos ou fechados, ou porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ou fechados ou no centro (RODGERS; DALVI, 1997; WALL; MESSIER, 2000).

A partir do século XXI tem aparecido alguns trabalhos propondo modelos matemáticos e computacionais para o comportamento de roedores no LCE. Os modelos foram baseados apenas em medidas espaço-temporais (SALUM; MORATO; SILVA, 2000; GIDDINGS, 2002; MIRANDA et al., 2009; TEJADA et al., 2010; TEJADA et al., 2009; COSTA et al., 2012) e supunham que os roedores foram submetidos pela primeira vez ao LCE. Esses modelos consideram que as variáveis espaço-temporais são suficientes para fornecer uma boa descrição de comportamentos relacionados à ansiedade de roedores no LCE. O objetivo desses estudos foi justificar certas hipóteses usadas para explicar o comportamento dos roedores no LCE, assim como tentar encontrar novas informações sobre as relações entre ansiedade e distribuições de posições e tempos no labirinto. Esses modelos utilizam ferramentas como cadeias de Markov e redes neurais artificiais (RNA).

#### 1.1.1 Caracterização por análise fatorial

Análise fatorial é um método estatístico que descreve a relação entre um conjunto de variáveis correlacionadas em termos de um pequeno conjunto de variáveis ocultas chamadas de fatores (HAIR et al., 2009). Exitem dois tipos de análise fatorial: análise de componente principal e análise fatorial confirmatória. A primeira tem um objetivo descritivo, enquanto a outra é mais complexa e pode validar estatisticamente um modelo postulado. Ambos os métodos envolvem o cálculo da matriz de correlação, a seleção de variáveis e uma estimativa do tamanho necessário da amostra.

Feita a análise fatorial o pesquisador tem em mãos uma tabela na qual as variáveis são listadas nas linhas e os fatores são listados nas colunas. Nos cruzamentos são dadas as correlações entre as variáveis e os fatores. O quadrado desse valor informa a variância que é explicada ou predita pelo fator para a variável.

A análise fatorial tem sido amplamente usada para validar diferentes medidas do comportamento de roedores no LCE (LISTER, 1987; FILE, 1992; FILE et al., 1993; TRULLAS; SKOLNICK, 1993; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; FERNANDES; FILE, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; HOLMES; RODGERS, 1998; WALL; MESSIER, 2000; WALL; MESSIER, 2001; DOREMUS; VARLINSKAYA; SPEAR, 2006; VIOLLE et al., 2009; SIMPSON et al., 2012). As medidas mais frequentemente usadas são as espaço-temporais, mas a frequência e tempo gasto em categorias etológicas também são bastante usadas. A grande maioria destes estudos utiliza análise de componente principal ao invés de análise confirmatória (WALL; MESSIER, 2000). Nas análises feitas são considerados pelo menos dois fatores, mas são reportados estudos com até seis fatores (RODGERS; JOHNSON, 1995; HOLMES; RODGERS, 1998). Em geral, estudos com mais de dois fatores, mostram correlações fortes da mesma variável com dois ou mais fatores, o que introduz ambiguidade e torna os resultados difíceis de serem interpretados (WALL; MESSIER, 2000).

Em geral o primeiro fator, ou seja, aquele que responde pela maior parte da variância, é associado à ansiedade. Isso porque esse fator normalmente tem forte correlação com variáveis tradicionalmente usadas como medida da ansiedade (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; FERNANDES; FILE, 1996; ROD-GERS; DALVI, 1997; WALL; MESSIER, 2000; VIOLLE et al., 2009). O segundo fator frequentemente mostra mais correlação com medidas de atividade locomotora como o número de entradas nos braços fechados. Por isso ele é normalmente associado à atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHN-SON, 1995; FERNANDES; FILE, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; WALL; MES-SIER, 2000). Em estudos que incluem um terceiro fator, ele normalmente apresenta maiores correlações com o tempo gasto na área central. Como esse tempo pode refletir processos de tomada de decisão, esse fator é frequentemente interpretado como associado a comportamentos de verificação de risco (RODGERS; JOHNSON, 1995; RODGERS; DALVI, 1997; WALL; MESSIER, 2000).

Estudos baseados em dois fatores (relacionados à ansiedade e atividade locomotora) não apresentam diferenças no comportamento exploratório do LCE entre ratos e camundongos. Entretanto, quando um terceiro fator é considerado ele apresenta diferenças porque camundongos permanecem no centro por períodos mais longos que ratos (RODGERS et al., 1999; WALL; MESSIER, 2001)

#### 1.1.2 Modelos do comportamento de roedores no LCE baseados em redes neurais artificiais

#### 1.1.2.1 O modelo de Salum, Morato e Roque

O primeiro modelo computacional para o comportamento de roedores no LCE foi o modelo de Salum, Morato e Silva (2000). Ele é baseado na hipótese de que o comportamento exploratório do rato no LCE resulta da competição entre dois motivadores opostos. O primeiro é a motivação para explorar um novo ambiente, que pode aparecer mesmo quando o novo ambiente é potencialmente perigoso. O segundo é a aversão natural do rato a espaços abertos e altos. O modelo pode ser visto como a implementação computacional dessa hipótese.

Este modelo representa a estrutura do LCE por uma RNA de 65 unidades. Dessas unidades, 21 estão associadas com quadrados nos quais o chão do labirinto foi dividido e pelos quais o rato pode se mover e as outras 44 unidades representam áreas que podem ser exploradas mas não ocupadas pelo animal, como uma parede ou uma abertura. Em cada passo de tempo apenas uma dessas unidades está ativa, representando a posição do rato ou o que ele está explorando. As unidades são conectadas por pesos  $\omega_{ij}$  que variam com o tempo e determinam qual unidade será ativa no próximo passo de tempo. A auto-conexão é permitida, então a unidade ativa em um dado instante pode vencer a competição e permanecer ativa no próximo instante de tempo.

Os pesos  $\omega_{ij}$  provêm de duas matrizes, a matriz de motivação M e a matriz de aversão A. Os pesos da matriz de motivação começam todos com o mesmo valor, mas decaem em função do número de vezes que a transição de j para i ocorre. Isso modela a perda de motivação para repetir comportamentos que se tornaram mais frequentes. Os pesos da matriz de aversão também começam todos com o mesmo valor, representando a aversividade inicial uniforme pelo novo ambiente onde o rato foi colocado. Mas a cada transição de j para i, esses pesos crescem ou decaem dependendo da unidade de destino i estar em um braço fechado ou aberto, respectivamente. O modelo tem outros parâmetros para ajustar a simulação a dados reais (SALUM; MORATO; SILVA, 2000). Um deles é um valor aleatório que dá um pequeno peso extra para um dos pesos  $\omega_{ij}$  correspondendo à possível transição da unidade j para a unidade i em cada passo de tempo. Essa escolha aleatória é baseada na direção do último movimento. No total, este modelo tem 12 parâmetros (SALUM; MORATO; SILVA, 2000).

O modelo também considera o tempo. Ele assume um intervalo de tempo de 2 segundos entre passos, e termina a simulação do teste quando todos os pesos ligando a unidade ativa a qualquer unidade caírem abaixo de um parâmetro próximo de zero (SALUM; MORATO; SILVA, 2000). Isso permitiu a Salum, Morato e Roque medirem, nas suas simulações, a porcentagem de tempo gasto em cada tipo de braço e na área central do LCE. Outra variável medida foi o número de entradas em cada tipo de braço. A média dos resultados de muitas simulações do modelo teve uma boa concordância quantitativa com resultados de experimentos realizados com animais reais (SALUM; MORATO; SILVA, 2000).

Em outro estudo, este modelo foi adaptado para representar duas variações do LCE, uma onde todos os braços do labirinto eram abertos e outra onde todos eram fechados. As simulações do modelo para esses casos de labirintos uniformes mostraram não haver preferência por explorar qualquer braço do labirinto, e essa predição foi posteriormente confirmada em experimentos com animais reais (SALUM; SILVA; MORATO, 2003).

#### 1.1.2.2 O modelo de Costa, Roque, Morato e Tinós

A tentativa mais recente de modelar o comportamento de roedores no LCE foi feita por Costa et al. (2012). Esse modelo usa a mesma representação do LCE adotada no modelo descrito anteriormente (SALUM; MORATO; SILVA, 2000). Neste o rato foi tratado como um agente modelado por uma RNA que recebe como entrada a informação de sua localização atual e gera como saída a decisão de se mover em uma de quatro possíveis direções: para frente, para trás, para a direita ou para a esquerda. Quando o agente está em um dos braços, os movimentos para a direita e esquerda correspondem a exploração da parede ou da abertura adjacente ao quadrado onde ele está.

A RNA usada pelo modelo foi uma rede de Elman (ELMAN, 1990). A rede de Elman é uma rede perceptron convencional de duas camadas (somente uma camada oculta) (HERTZ; KROGH; PALMER, 1991) mais uma camada de contexto. As unidades da camada de contexto recebem como entradas as saídas da camada oculta no passo de tempo atual e enviam suas saídas para a camada oculta no próximo passo de tempo. Portanto, a rede de Elman é uma rede recorrente em que informação do passado é adicionada à informação do presente para influenciar a decisão presente. Este modelo usa passo de tempo de 1 segundo. A unidade de entrada codifica informações quanto à localização atual, como a presença ou ausência de paredes aos lados, à frente ou atrás.

Os pesos usados na RNA do modelo foram selecionados por um algoritmo genético que usa como função de ajuste uma função variável no tempo dada pela soma de dois termos, um correspondendo à recompensa e o outro à punição. A cada passo de tempo, o termo de recompensa soma uma constante à função de ajuste caso a posição atual não tenha sido visitada durante um número de passos de tempo no passado; e o termo de punição pode diminuir a função de ajuste por outro valor fixo de acordo com valores aleatórios que dependem da posição atual: se ele está em um braço aberto, em um braço fechado ou no quadrado central (COSTA et al., 2012). É interessante notar que, devido à função de ajuste usada, o critério de escolha do melhor individuo não depende de comparações com dados experimentais mas é simplesmente escolhido o individuo que obtiver o valor mais alto para a função de ajuste no final do teste de 5 minutos no LCE simulado.

Costa et al. (2012) selecionaram os melhores indivíduos do modelo e compararam a média dos seus comportamentos com aqueles de ratos reais submetidos ao teste do LCE. As medidas usadas por eles foram o tempo gasto nos braços abertos e fechados e na área central. Eles também usaram a representação em cadeia de Markov do LCE proposta por Tejada et al. (2010) (ver abaixo) para estimar as matrizes de transição para os seus ratos reais e simulados. A partir disso eles obtiveram distribuições estacionárias de probabilidade, que também foram comparadas com medidas de ratos reais. As comparações foram qualitativamente boas, mas algumas diferenças foram encontradas. O tempo gasto no centro foi muito menor nos ratos simulados do que nos reais; e a probabilidade estacionária do rato simulado estar no início do braço fechado (próximo ao centro) foi maior do que a de estar em seu final, contrário ao que é observado nos animais reais.

#### 1.1.3 Modelos probabilísticos

#### 1.1.3.1 O modelo de Giddings

Outra tentativa de modelar o comportamento do rato no LCE foi feita por Giddings (2002). Ao contrario dos modelos descritos na subseção anterior (SALUM; MORATO; SILVA, 2000; COSTA et al., 2012), o modelo de Giddings não assume nenhuma hipótese sobre possíveis mecanismos por trás do comportamento do rato no LCE. Trata-se de um tipo de modelo baseado em regras, caracterizado por um conjunto, obtido empiricamente, de probabilidades do próximo movimento ou comportamento do rato dependendo de onde ele está e seu último movimento.

No modelo de Giddings (GIDDINGS, 2002), os braços do LCE também foram divididos em quadrados (dessa vez três) que indicam as posições em que o rato pode estar. Quando o rato está em algum braço ele pode se mover para a frente, para trás, explorar uma das áreas laterais (parede ou abertura dependendo do tipo do braço) ou permanecer parado. Além disso, quando o rato está em um quadrado do braço fechado adjacente ao centro ele também pode assumir um comportamento de verificação de risco. E quando o rato está na posição central ele pode se mover para um dos braços, permanecer parado ou assumir um comportamento de verificação de risco. E quando o assumir um comportamento de verificação de risco. Então, usando dados de experimentos com ratos reais no LCE e alguns ajustes finais, Giddings (2002) produziu um conjunto de sete distribuições de probabilidade para o comportamento do rato no LCE (GIDDINGS, 2002). Por exemplo, uma delas dá as probabilidades do comportamento do rato quando ele está no braço aberto e se moveu em direção à extremidade do braço no último passo.

Para simular um teste com seu modelo, Giddings (2002) assumiu que cada teste tem uma quantidade fixa de passos de tempo, durando 1 segundo cada. Então foram usados 300 passos para simular um teste de 5 minutos. Com isso Giddings (2002) pode medir, para um teste simulado, a porcentagem de tempo e de entradas em cada braço. A média de resultados das simulações produzidas por Giddings (2002) concordaram bem com dados experimentais de ratos reais, tanto da amostra utilizada para produzir as distribuições de probabilidade quanto de uma nova amostra (GIDDINGS, 2002).

#### 1.1.3.2 Caracterização por teoria dos grafos

Os estudos de análise fatorial mencionados mostram a importância da quantidade relativa de entradas e tempo gasto nos braços abertos como medida de ansiedade. Porém, essas medidas não fornecem informações sobre a atividade espacial do roedor dentro do braço aberto. Por exemplo, elas não dão informações a respeito de o animal explorar mais a área próxima ao centro ou uniformemente toda a extensão do braço aberto. Além disso, elas não permitem saber como a atividade espacial dentro dos braços abertos se relaciona com a atividade espacial dentro dos braços fechados.

Com o objetivo de construir um método que capture a atividade espacial de um roedor no LCE, que reflita a intensidade relativa de atividade espacial dentro dos braços abertos e fechados, e ainda possa ser usada como uma medida de ansiedade, Tejada et al. (2009) propuseram a representação do LCE como um grafo (DIESTEL, 2006). Para essa representação, de forma semelhante ao que havia sido feito por Salum, Morato e Roque, o LCE foi dividido em quadrados (figura 1.2a) que podem ser tratados como nós de um grafo.

Aproveitando a simetria do LCE, Tejada et al. (2009) usaram uma representação reduzida (figura 1.2b) para a construção do grafo. Nesta representação um braço aberto é dobrado sobre o outro braço aberto e um braço fechado é dobrado sobre o outro braço fechado. Os nós numerados de 1 a 5 correspondem aos braços abertos, o nó número 6 corresponde à posição central e os nós de 7 a 11 correspondem aos braços fechados. De acordo com a topologia do LCE, as arestas são definidas de forma a representar as possíveis movimentações do animal no LCE (figura 1.2c). Essa representação reduzida diminui o viés do nó central, porque o comunica com apenas dois nós, como qualquer outro nó do grafo. Isso também é conveniente para a análise estatística pois aumenta a quantidade de frequências medidas.

A representação do LCE em termos de um grafo captura o deslocamento interno do roedor nos braços como transições entre nós. Como a área central também é um nó, essa representação também captura informações da transição entre a área central e os quadrados adjacentes dos braços abertos e fechados. Então, contando as



Figura 1.2: Divisão do chão do labirinto em quadrados a serem tratados como nós de um grafo. (a) As bordas mais grossas representam os braços fechados. Cada posição recebeu uma identificação numérica, posições consideradas iguais devido à simetria receberam a mesma identificação. (b) Representação reduzida do LCE. (c) Representação do LCE com um grafo. Cada posição é considerada um nó do grafo e as transições possíveis são representadas pelas suas arestas.

frequências relativas de cada transição e representando-as em um gráfico ranqueado (NEWMAN, 2005; KINOUCHI et al., 2008), tem-se a representação da atividade espacial do roedor no LCE. Esse gráfico pode ser ajustado por uma função cuja inclinação é uma medida simples que representa a atividade espacial do roedor no LCE (TEJADA et al., 2009).

Usando essa representação Tejada et al. (2009) mostraram que o gráfico ranqueado obtido se ajusta bem a uma lei de potência. Ao aplicar esse método a diferentes grupos farmacológicos, a lei de potência obtida pelos seus ratos do grupo controle foi comparada com aquela obtida para ratos submetidos a tratamentos farmacológicos. Essa comparação mostrou que o expoente da lei de potência (k) pode ser usado para identificar o tipo de tratamento. Ratos expostos a drogas ansiogênicas mostraram um k maior que ratos controle, que por sua vez mostraram um k maior que ratos expostos a drogas ansiolíticas. Além disso, para uma dada droga ansiogênica o expoente k foi sensível à dose da droga: quanto maior a dose maior o valor de k.

Além da caracterização de comportamentos relacionados à ansiedade em ratos, o método proposto por Tejada et al. (2009) permite uma análise comparativa das transições dos ratos dentro dos braços. Outra observação interessante é que a distribuição do ranking das transições entre nós depende do tratamento farmacológico. Para ratos controle as transições mais frequentes eram todas dentro dos braços fechados. O mesmo ocorreu para todos os grupos submetidos a drogas ansiogênicas. Ao contrário, os grupos ansiolíticos apresentaram um padrão mais misto, havendo inclusive transições envolvendo nós dos braços fechados. Outro resultado interessante foi que os nós envolvidos nas transições mais frequentes foram os que se localizam no meio do braço fechado.

A metodologia proposta por Tejada et al. (2009) permite acesso à microestrutura do comportamento espacial do roedor no LCE. Ela, portanto, é uma contribuição para o arsenal de ferramentas usadas para caracterizar o comportamento de roedores no LCE e sugere o desenvolvimento de uma versão automatizada do método para torná-lo fácil de ser usado por outros pesquisadores da área.
#### 1.1.3.3 O modelo de Tejada, Bosco, Morato e Roque

Uma consequência da representação em grafo do LCE (TEJADA et al., 2009) é que ele permite tratar a movimentação dos roedores no labirinto como movimentos de uma partícula pelo grafo. Baseado nisso foi proposto o modelo de Tejada, Bosco, Morato e Roque, que sugere uma primeira aproximação para o comportamento do rato no LCE por uma cadeia de Markov homogênea (TEJADA et al., 2010).

Uma cadeia de Markov é um tipo de processo estocástico no qual o estado futuro do sistema depende apenas do estado atual e não do passado (BERTSEKAS; TSITSIKLIS, 2002). A designação cadeia de Markov geralmente se refere a tempo discreto, ou seja, um processo estocástico onde o tempo é representado por números naturais (0, 1, 2, etc). Ela é dita homogênea se a probabilidade  $p_{i,j}$  de passar do estado *i* para *j* for constante ao longo do tempo.

Para aplicar cadeias de Markov a dados reais deve-se determinar a matriz de transições. Em geral, tem-se uma amostra composta pela sequência de estados assumidos por um sistema particular. A partir dessa amostra calcula-se um estimador de máxima verossimilhança de  $p_{i,j}$ , que é dado pela divisão do número de transições de *i* para *j* pelo total de transições partindo de *i* (GUTTORP, 1995). Um teste da razão de máxima verossimilhança é geralmente aplicado para confirmar a hipótese Makoviana contra a hipótese nula de que a amostra é uma sequência de estados independentes.

O conjunto dessas probabilidades estimadas é organizado na matriz de probabilidades **P**. Caso a cadeia de Markov possua certas propriedades matemáticas (irredutibilidade e aperiodicidade, que estão melhor explicados na seção 2.1) existe um vetor  $\pi$ , tal que  $\pi \cdot \mathbf{P} = \pi$ , que recebe o nome de distribuição estacionária ou de equilíbrio da cadeia (DURRETT, 2009; KEMENY; SNELL, 1976).

Este modelo foi construído a partir dos dados de três grupos de ratos: controle, ansiolíticos e ansiogênicos (TEJADA et al., 2010). Neste modelo os 11 nós da representação em grafo são considerados estados da cadeia de Markov e suas arestas representam as únicas transições permitidas pelo modelo. Portanto, transições de um estado para ele mesmo são desconsideradas. O número de passos de tempo é o número de transições completas (com as quatro patas) entre quadrados feitas pelo rato durante um teste de 5 minutos. Então o tempo gasto em um quadrado e o tempo entre transições não são considerados. Devido à estrutura do grafo, a probabilidade de transição do estado 1 para o estado 2, bem como do estado 11 para o estado 10, é igual a um. As demais probabilidades de transição são estimadas como explicado acima.

As distribuições de equilíbrio obtidas com o modelo para as três condições farmacológicas estão de acordo com estudos anteriores do comportamento do rato no LCE (TEJADA et al., 2010). Para o grupo controle as probabilidades de permanecer nos braços aberto e fechado foram, respectivamente, 17% e 75% aproximadamente. Para o grupo ansiogênico essas probabilidades foram 9% e 82% enquanto para o grupo ansiolítico essas probabilidades foram ambas aproximadamente iguais a 45%. A probabilidade de permanecer na posição central foi aproximadamente 9% para todos os grupos. As matrizes de transições do modelo foram usadas para simular a parte espacial (entradas, mas não tempo gasto, em ambos os braços) do padrão exploratório do rato no LCE para os três grupos. Os resultados (médias das simulações) são apenas qualitativamente similares às observadas nos animais reais. Porém, elas capturam a tendencia comportamental do rato sob cada condição farmacológica (TEJADA et al., 2010).

# 1.2 Motivação, Objetivos e Estrutura da Tese

Os quatro modelos descritos podem ser divididos em dois grupos, como foram na seção anterior (1.1). Um deles é o dos modelos que seguem a teoria de motivadores do comportamento (seção 1.1.2). Esse grupo contém os modelos de Salum, Morato e Silva (2000) e de Costa et al. (2012), que são baseados na competição entre motivação e aversão. O outro é o que usa regras probabilísticas construídas empiricamente (seção 1.1.3), que contém os modelos de Giddings e de Tejada et al. (2010). Estes modelos não partem de hipóteses sobre o comportamento do rato, mas se baseiam em medidas de frequências de certos deslocamentos ou ações que ocorrem no labirinto a ser modelado. Os modelos do grupo probabilístico têm um apelo menor do ponto de vista teórico, mas têm potencial, caso melhorados, de fornecer um ajuste mais acurado às medidas experimentais. O interesse nesses modelos poderia estar em usá-los para gerar dados controle para testes de ansiedade ao invés de sacrificar animais, ou como ferramentas educacionais para mostrar aos alunos o efeito esperado das drogas sobre o nível de ansiedade do animal, como por exemplo no projeto "Sniffy: the virtual rat" (GRAHAM; ALLOWAY; KRAMES, 1994; JAKUBOW, 2007). Por outro lado, uma crítica ao modelo de Tejada et al. (2010) é o fato de ele não propor um índice conciso, cujos valores diferenciem os grupos ansiogênico, ansiolítico e controle.

Nesse contexto, esta tese tem como primeiro objetivo, propor um índice capaz de sintetizar os resultados encontrados por Tejada et al. (2010). Tal objetivo foi alcançado da forma descrita no capítulo 2 que propõe dois índices. Um deles usa os tempos médios de primeira visita a cada posição do LCE, calculados a partir das respectivas matrizes de transição (BOSCO et al., 2012; ARANTES et al., 2013; ARANTES et al., 2013b). O outro usa as distribuições estacionárias de probabilidade. Além de sintetizar os resultados obtidos em Tejada et al. (2010), os resultados alcançados mostram que o primeiro é capaz de diferenciar grupos de ratos submetidos a diferentes tipos de tratamento.

Por outro lado, uma outra melhoria importante, que constitui o segundo objetivo desta tese, é mudar da modelagem a tempo discreto para a modelagem a tempo contínuo. Tendo isto em mente, o capítulo 3 deste trabalho propõe, ainda, um modelo com cadeias de Markov a tempo contínuo. Para a construção de tal modelo, foram utilizados os mesmos dados do modelo introduzido no parágrafo anterior e mesmos estados definidos por ele. O tempo gasto pelos grupos de ratos para fazer cada transição foi utilizado para estimar as taxas de transição, que são organizadas como matrizes. Os resultados mostraram que essas matrizes também possuem características interessantes para discriminar diferentes tratamentos (ARANTES et al., 2015). Além de revelar informações adicionais que haviam sido perdidas pelo modelo anterior.

Apesar de possíveis fontes de viés, aplicações de análise fatorial ao teste LCE têm revelado consistentemente a importância de parâmetros etológicos, além das tradicionais medidas espaço-temporais usadas, para caracterizar o comportamento do rato no LCE. Uma análise recente do comportamento do rato no teste LCE baseada em uma técnica diferente também revelou a importância da inclusão desses parâmetros para caracterizar o comportamento dos animais (CASARRUBEA et al., 2013). Então, modelos teóricos existentes também podem ser estendidos para incluir medidas etológicas no repositório de comportamentos possíveis do animal.

Neste contexto, esta tese tem ainda o objetivo de analisar estes comportamentos através de um modelo por cadeia de Markov. Tal objetivo foi coberto pelo capítulo 4 que propõe um modelo de cadeias de Markov considerando como estados dessa cadeia o seguinte conjunto de comportamentos: *rearing, stretching, dipping, freezing* e *grooming*. Foi usado o mesmo método de modelagem descrito em Tejada et al. (2010), analisando ratos dos grupos controle, ansiogênico e ansiolítico. Assim como em Tejada et al. (2010), os resultados mostraram diferenciação entre os grupos (BOSCO et al., 2013).

Por fim, no capítulo 5 são sumarizadas as principais discussões e conclusões obtidas por este trabalho. Apresentando suas contribuições mais importantes para o estudo do comportamento de ratos no LCE, bem como as questões que não foram cobertas por este, ficando abertas para serem estudadas em trabalhos futuros da área.

# Capítulo 2

# MODELAGEM A TEMPO DISCRETO

Neste capítulo serão descritos dois novos índices para diferenciação do padrão de comportamento de ratos, no labirinto em cruz elevado, expostos a diferentes tipos de drogas. A base para a construção desse índice foi o modelo proposto em Tejada et al. (2010) que usa cadeias de Markov a tempo discreto, descrito na seção 1.1.3.3. Um desses índices usa o conceito de tempo médio de primeira visita às 11 posições em que o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é dividido. O outro, parte das distribuições estacionárias de probabilidade.

Para definir esses conceitos e os índices propostos, serão introduzidos na próxima seção (2.1) alguns conceitos de probabilidade e de cadeias de Markov a tempo discreto. A seção seguinte (2.2) apresentará uma breve descrição dos materiais e amostras utilizados nesta modelagem. Em seguida, a seção 2.3 explicará como foi construído e analisado o modelo para chegar ao índice proposto. Finalmente, os resultados encontrados serão apresentados e discutidos na seção 2.4.

## 2.1 Cadeias de Markov a Tempo Discreto

O conceito de variável aleatória será bastante usado neste trabalho, e portanto, é importante defini-lo. Para um espaço amostral  $\Omega$ , uma variável aleatória é uma função de  $\Omega$  em  $\mathbb{R}$ . Em um processo estocástico, temos uma sequência de variáveis aleatórias  $X_t, t \geq 0$ , assumindo valores em um conjunto chamado de espaço de estados, que será denotado por S. Em palavras, um processo estocástico é uma sequência de variáveis aleatórias indexadas pelo tempo que assumem os estados de um sistema. Pode-se pensar, por exemplo, no clima de uma cidade ao longo do tempo, um sistema que pode assumir os estados chuvoso, ensolarado e nublado, que constituem o espaço de estados. No caso discreto o tempo é indexado pelos números naturais,  $t = n \in \mathbb{N}$ , e se ignora a quantidade de tempo que o sistema passa nos estados, observando somente as mudanças ou transições de um estado para outro. Um processo estocástico é markoviano, ou obedece a propriedade de Markov, quando só é necessário conhecer o presente (tempo n) para saber o futuro (tempo n + 1), ou seja, dado o estado corrente, qualquer outra informação a respeito do passado é irrelevante para predizer o futuro. Nesse contexto pode-se exibir a seguinte definição de cadeia de Markov a tempo discreto.

**Definição 2.1.1 (Cadeias de Markov)** Seja  $(X_n : n \in \mathbb{N})$  um processo estocástico a tempo discreto no qual as variáveis aleatórias assumem valores em um espaço de estados finito  $S = \{1, 2, \dots, s\}$ . Esse processo é chamado de cadeia de Markov se obedecer a propriedade de Markov, que se traduz em termos matemáticos como

$$\mathbb{P}(X_{n+1} = x_{n+1} | X_0 = x_0, X_1 = x_1, \dots, X_n = x_n) = \mathbb{P}(X_{n+1} = x_{n+1} | X_n = x_n) \quad (2.1)$$

As probabilidades de transição de um estado *i* para um estado *j* serão denotadas por  $p_{i,j}$ , ou seja,  $p_{i,j} = \mathbb{P}(X_{n+1} = j | X_n = i)$ :  $i, j \in S$ , que são as probabilidades da cadeia ir de um estado *i* para um estado *j* em um passo. O estado inicial e as probabilidades de transição entre os estados do sistema definem uma cadeia de Markov.

As probabilidades de transição são os elementos de uma matriz  $\mathbf{P}$ , que é chamada de matriz de transição de uma cadeia de Markov, ou de forma mais geral de matriz estocástica. Nessa matriz, cada linha corresponde a um estado *i* no qual a cadeia se encontra, e cada coluna, corresponde ao estado *j* para o qual a cadeia pode ir em um passo. Portanto, em cada linha estão as probabilidades,  $p_{i,j}$ , do estado *i* mudar para os estados *j*, em um passo ou transição, e essas probabilidades somam 1. Como exemplo, para um espaço de estados com 3 estados,  $S = \{1, 2, 3\}$ , a matriz de probabilidades de transição ou matriz estocástica poderia ser como segue abaixo.

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} p_{1,1} & p_{1,2} & p_{1,3} \\ \\ p_{2,1} & p_{2,2} & p_{2,3} \\ \\ p_{3,1} & p_{3,2} & p_{3,3} \end{pmatrix}$$

onde  $p_{i,i}$ , i = 1, 2, 3, seria a probabilidade da Cadeia não sair do estado i.

Se  $\mathbb{P}(X_{n+1} = j | X_n = i)$  não muda em função de n, ou seja, a matriz  $\mathbf{P}$  não muda ao longo do tempo, a cadeia de Markov é chamada de homogênea no tempo. Por outro lado,  $p_{i,j}^{(m)} = \mathbb{P}(X_{n+m} = j | X_n = i)$  é a probabilidade da cadeia ir de um estado i para um estado j em m > 1 passos ou transições. A propriedade de Markov e as operações básicas do produto matricial permitem obter essas probabilidades de maneira eficiente. A matriz formada pelos elementos  $(p_{i,j}^{(m)})$ ,  $i, j \in S$  será denotada por  $\mathbf{P}^m$ . Nesse contexto, é natural que se pense no seguinte limite,

$$\lim_{m \to \infty} p_{i,j}^{(m)} = \lim_{m \to \infty} \mathbb{P}(X_m = j | X_0 = i), \text{ para qualquer } j \in S,$$
(2.2)

isto é, se pense no que acontece com uma cadeia de Markov, quando o tempo (m) vai para o infinito, ou é suficientemente grande, que é a realidade de uma experiência em psicobiologia. Pode-se falar que a cadeia de Markov tende para um estado de equilíbrio, no qual assume um estado i, em uma proporção constante de vezes, que será chamada de  $\pi_i$ .

Matematicamente falando, esse limite existe e é único se a cadeia de Markov for irredutível e aperiódica. Uma cadeia é irredutível se todos os estados se comunicam uns com os outros, ou seja, se para todo  $i, j \in S$ , existe n, tal que  $p_{i,j}^{(n)} > 0$ . Ou, equivalentemente, existe uma sequência  $i_0, i_1, i_2, \dots, i_{n-1}, j$  que começa em i e termina em j de tal forma que  $p_{i_0,i_1} > 0, p_{i_1,i_2} > 0, \dots, p_{i_{n-1},j} > 0$ . O conceito de aperiodicidade não é de rápida explicação, mas pode-se dizer que uma cadeia irredutível é aperiódica quando todos os seus estados podem ser acessados em qualquer número de passos ou transições. Para uma cadeia irredutível periódica, com período 2, por exemplo, ao partir de um estado i, a cadeia só retorna a esse estado em um número par de passos. Um exemplo simples de uma cadeia de Markov irredutível, de período 2, seria para  $S = \{1, 2, 3\},\$ 

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ p_{2,1} & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix},$$

onde  $p_{2,1} \neq 0$ ,  $p_{2,3} \neq 0$ ,  $p_{2,1} + p_{2,3} = 1$  e  $p_{1,2} = p_{3,2} = 1$ .

Pode-se observar, nesse exemplo, que ao sair do estado 1, só é possível voltar a esse estado em 2, 4, 6,  $\cdots$  passos. Isso acontece também para os outros dois estados. Se o estado inicial for 2, então a cadeia só retorna a esse estado depois de um número par de passos, contudo, visita o estado 1 (ou 3) somente depois de uma quantidade ímpar de passos. Essa característica faz com que uma cadeia de Markov não convirja para o equilíbrio citado acima. Assim, pode-se dizer que o conceito de irredutibilidade garante que o limite exposto na equação 2.2 seja único, e o conceito de aperiodicidade garante, por sua vez, que a cadeia convirja para esse limite, ou seja, que ele exista.

O limite na equação 2.2 é denotado por  $\pi$ , que é na verdade um vetor, ou seja, para  $S = \{1, 2 \cdots s\}, \pi = (\pi_1, \pi_2, \cdots \pi_s),$  e é chamada de medida estacionária ou de equilíbrio, distribuição estacionária ou de equilíbrio, ou ainda, medida invariante. Pode ser provado que  $\pi$  é o autovetor de autovalor 1 de **P**, ou seja, o vetor  $\pi$  pode ser encontrado a partir da equação 2.3.

$$\pi \mathbf{P} = \pi \tag{2.3}$$

Além do comportamento limite de uma cadeia de Markov, também há quantidades interessantes que podem ser calculadas para os chamados tempos curtos. Dada uma cadeia de Markov com espaço de estados finito, podem ser calculados, a partir de sua matriz estocástica, tempos médios de primeira visita a determinado estado, dado o estado inicial. É importante observar que esses tempos médios são medidos em termos de transições ou passos. Seja k um estado para o qual se quer determinar esse tempo médio, e i o estado inicial, então esse tempo médio é definido, mais precisamente, por:

$$\begin{split} t_i &= \mathbb{E}(\text{passos até chegar no estado } k \text{ pela 1}^{\text{a}} \text{vez começando no estado } i) \\ &= \mathbb{E}(\min\{n \geq 0 : X_n = k \mid X_0 = i\} \ ) \end{split}$$

Então, os valores de  $(t_i)_{i \in S}$  são soluções únicas (BERTSEKAS; TSITSIKLIS, 2002) para o sistema a seguir:

$$t_{i} = \begin{cases} 0, & i = k \\ 1 + \sum_{j \neq k} p_{i,j}t_{j}, & i \neq k \end{cases}$$

$$(2.4)$$

Em palavras, se i = k, a cadeia já atingiu o estado k e não é necessária nenhuma transição para atingi-lo, e portanto  $t_i = 0$ . Se  $i \neq k$ , então é necessária uma transição do estado i para um estado, que pode ou não ser k. Se for k, então só uma transição é suficiente (o valor 1 da fórmula), caso contrário há uma transição, mais as transições do estado i para os estados j para os quais  $p_{i,j} \neq 0$ , correspondente à somatória na fórmula.

Para o exemplo acima para  $S = \{1, 2, 3\}$  e

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ p_{2,1} & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix},$$

as equações para os tempos médios de primeira visita ao estado 1, por exemplo são:

$$t_{1} = 0,$$

$$t_{2} = 1 + p_{2,1}t_{1} + p_{2,3}t_{3}$$

$$t_{3} = 1 + p_{3,2}t_{2} = 1 + t_{2}$$
(2.5)

Então, por exemplo,  $t_2$  é o tempo médio de primeira visita ao estado 1 dado que a cadeia iniciou no estado 2. Sabendo-se os valores de  $p_{2,1}$  e  $p_{2,3}$ , encontram-se os valores de  $t_2$  e  $t_3$ .

# 2.2 Materiais e Amostras

Este trabalho não inclui a manipulação direta de nenhum animal, estando portanto, isento da necessidade de avaliação por um comitê de ética no uso experimental de animais. As amostras aqui utilizadas consistem de arquivos texto gerados em trabalhos anteriores (TEJADA et al., 2009) a partir do protocolo descrito na subseção 2.2.2. Tais registros provêm de diversos outros trabalhos realizados anteriormente, os quais utilizaram os animais descritos na subseção 2.2.1.

#### 2.2.1 Sujeitos

Foram utilizados os registros da exploração do LCE por 107 ratos gentilmente cedidos pelo laboratório de comportamento exploratório da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. É importante ressaltar que tais registros são provenientes de diversos trabalhos realizados anteriormente, que foram reaproveitados neste trabalho.

Os ratos eram Wistar adultos machos pesando entre 210 e 230 gramas que haviam sido submetidos ao teste do LCE sob as seguintes condições farmacológicas: tratados com droga ansiogênica (pentilenotetrazol (PTZ) e semicarbazida (SCZ)), tratados com droga ansiolítica (clordiazepox (CDP) e midazolam (MDZ)) e controle. A quantidade de ratos e a dosagem das drogas de cada grupo experimental são dados na tabela 2.1.

A divisão das drogas citadas em grupos ansiolítico e ansiogênico segue da validação feita por diversos trabalhos acerca destes efeitos, tais como: Pellow et al. (1985), Hogg (1996), Rodgers e Johnson (1995) para CDP; Cruz, Frei e Graeff (1994), Carobrez e Bertoglio (2005) para MDZ; Aguiar e Brandão (1996), Maranghi et al. (2009) para SCZ; Cruz, Frei e Graeff (1994), Hogg (1996) para PTZ; Tejada et al. (2009) para todas as drogas utilizadas. É importante observar porém, que para a menor dose de PTZ utilizada (10mg/kg) o efeito ansiogênico não é observado, o que pode ter gerado contaminação dos dados dos grupos intitulados PTZ e Ansiogênico.

Droga	Dose $(mg/Kg)$	Quantidade
Controle	þ	25
Grupo A	Ansiolítico	38
CDP	5	21
MDZ	1	17
Grupo A	Ansiogênico	44
SCZ	20	11
ΡTΖ		33
PTZ	10	12
PTZ	20	12
PTZ	30	9

Tabela 2.1: Quantidade de ratos e dosagem de drogas em cada grupo experimental.

#### 2.2.2 Protocolo

O protocolo usado nos experimentos foi o seguinte: inicialmente cada rato foi colocado no centro do LCE, com seu focinho direcionado para algum dos braços fechados. Na sequência, o rato foi filmado durante 5 minutos. O LCE foi então, virtualmente dividido em 21 quadrados e, com o auxílio do vídeo e do software X-Plot-Rat foram registradas todas as transições entre quadrados realizadas pelo rato, além de outros comportamentos tradicionalmente relacionados com a ansiedade (que serão listados no capítulo 4) observados durante os 5 minutos de exploração.

Como mencionado anteriormente, tal protocolo foi executado em trabalhos anteriores, não neste trabalho. Durante o desenvolvimento deste trabalho, com o objetivo de se familiarizar com as técnicas de obtenção de tais registros, foram assistidas algumas gravações realizadas por outras pesquisas no laboratório que forneceu os dados. Também com este intuito foi manipulado o software citado (X-Plot-Rat) para geração de registros. Porém tal manipulação teve objetivo exclusivamente didático, sendo utilizado para isso vídeos aleatórios, que poderiam já fazer ou não parte



Figura 2.1: Divisão do chão do labirinto em quadrados a serem tratados como estados de um processo estocástico. Conforme mostrado anteriormente na figura 1.2, as posições 1 a 5 correspondem aos braços abertos, as posições 7 a 11 correspondem aos braços fechados e a posição 6 corresponde ao centro do labirinto. Esta figura apenas acrescenta àquela as probabilidades de transições entre os estados.

dos registros utilizados neste trabalho. Por esse motivo nenhum destes registros foi incorporado àqueles utilizados no decorrer deste trabalho.

## 2.3 Construção do Modelo

Como já foi visto na seção 1.1.3.3 o LCE ficou resumido a 11 posições, sendo as posições 1, 2, 3, 4 e 5 no braço aberto, a posição 6 na parte central, e as posições 7, 8, 9, 10 e 11 no braço fechado. Estando na posição i, o rato pode ir para as posições i - 1 e i + 1, com exceção das posições 1 e 11, de onde só pode ir para as posições 2 e 10, respectivamente. Esta explicação é representada graficamente na figura 2.1.

No trabalho de Tejada et al. (2010) ficou claro que o modelo Markoviano é um modelo adequado para descrever o comportamento de ratos no LCE. Assim sendo, as probabilidades de transição,  $p_{i,j}$ , foram estimadas pelo princípio da máxima

	1										\
	0	$p_{1,2}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	$p_{2,1}$	0	$p_{2,3}$	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	$p_{3,2}$	0	$p_{3,4}$	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	$p_{4,3}$	0	$p_{4,5}$	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	$p_{5,4}$	0	$p_{5,6}$	0	0	0	0	0
$\mathbf{P} =$	0	0	0	0	$p_{6,5}$	0	$p_{6,7}$	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	$p_{7,6}$	0	$p_{7,8}$	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	$p_{8,7}$	0	$p_{8,9}$	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	$p_{9,8}$	0	$p_{9,10}$	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	$p_{10,9}$	0	$p_{10,11}$
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$p_{11,10}$	0 /

Figura 2.2: Formato da matriz de probabilidades de transição para o modelo representado na figura 2.1

verossimilhança aplicado às cadeias de Markov a tempo discreto (GUTTORP, 1995), fornecendo os seguintes estimadores para as mesmas:

$$\hat{p}_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_{i\cdot}}$$
, para todo  $i, j \in S$ ,

onde  $n_{i}$ . é a quantidade de vezes que o processo passa do estado *i* para qualquer outro estado e  $n_{i,j}$  é a quantidade de vezes que o processo passa do estado *i* para o estado *j*. Essas probabilidades compõem as matrizes de transições que possuem o formato mostrado na figura 2.2.

Para a construção destas matrizes, os registros utilizados, descritos na seção 2.2, foram processados por um programa implementado na linguagem Java (GOSLING et al., 2005). Este programa extrai de cada arquivo a sequência de posições ocupadas pelos ratos no LCE ao longo da sessão de 5 minutos, bem como o instante de tempo do experimento em que ela foi assumida. Informações sobre tempo não foram consideradas nesta modelagem, apenas a sequencia de posições ocupadas pelos ratos nos 5 minutos de sessão foi considerada.

O mesmo software calculou o total de transições entre cada par de estados reali-

zadas, para cada rato bem como o total de cada grupo. E utilizou esses totais para calcular as probabilidades  $p_{i,j}$  gerando as matrizes de transições de cada rato e de cada grupo.

Um teste comumente usado para a análise de tabelas de contingência é o teste  $\chi^2$  de independência (HOGG; TANIS, 2001). Este teste é muito usado para verificar a independência de uma característica em relação a dois ou mais grupos. Em outras palavras, há uma característica (ter câncer de pulmão, por exemplo) a ser estudada, e quer se saber se ela depende do grupo considerado (grupo de homens e grupo de mulheres, por exemplo). Neste teste, a hipótese nula,  $H_0$ , é da característica não depender do grupo considerado, e a hipótese alternativa,  $H_1$ , é da característica

O teste  $\chi^2$  de independência foi aplicado às probabilidades de transição associadas aos estados 2,3,..., 10, que fazem transições para outros dois estados (i + 1 e i - 1), com o intuito de verificar se há uma tendência para um destes dois estados. No contexto das matrizes estocásticas, foi considerada como hipótese nula,  $H_0$ , não haver tendência para qualquer dos estados, o que se traduz em ter-se,  $p_{i,i-1} = p_{i,i+1} = 0,50$ , enquanto que a hipótese alternativa se traduz por  $p_{i,i-1} \neq p_{i,i+1}$ . Foram calculados os *p*-valores para todos os pares de probabilidades de transição e para todas as matrizes.

Em seguida, assim como havia sido feito por Tejada et al. (2010), foram calculadas pelo programa as distribuições estacionárias de probabilidade para cada grupo (equação 2.3). Isso foi feito com o objetivo de investigar uma proposta de índice que seja capaz de distinguir entre os diversos tratamentos. A partir dos resultados obtidos, que serão apresentados na seção de resultados (2.4), foi proposto um índice. Porém, este primeiro índice proposto não apresentou bons resultados, levando à procura de um candidato melhor.

Finalmente, através das matrizes o programa calcula os tempos médios de primeira visita em cada estado através da resolução de sistemas de equações lineares, conforme explicado na seção 2.1 (equação 2.4). É importante enfatizar que estes tempos são medidos em quantidade de transições, e não em unidades de tempo, uma vez que este modelo não considera o tempo. No caso específico deste modelo o sistema está reescrito, de forma mais didática, na equação 2.6.

$$t_{1} = 1 + p_{1,2}t_{2} = 1 + t_{2}$$

$$t_{2} = 1 + p_{2,1}t_{1} + p_{2,3}t_{3}$$

$$t_{3} = 1 + p_{3,2}t_{2} + p_{3,4}t_{4}$$

$$t_{4} = 1 + p_{4,3}t_{3} + p_{4,5}t_{5}$$

$$t_{5} = 1 + p_{5,4}t_{4} + p_{5,6}t_{6}$$

$$t_{6} = 1 + p_{6,5}t_{5} + p_{6,7}t_{7}$$

$$t_{7} = 1 + p_{7,6}t_{6} + p_{7,8}t_{8}$$

$$t_{8} = 1 + p_{8,7}t_{7} + p_{8,9}t_{9}$$

$$t_{9} = 1 + p_{9,8}t_{8} + p_{9,10}t_{10}$$

$$t_{10} = 1 + p_{10,9}t_{9} + p_{10,11}t_{11}$$

$$t_{11} = 1 + p_{11,10}t_{10} = 1 + t_{10}$$
(2.6)

Com o objetivo de determinar o número médio de transições até o rato atingir cada estado k tendo partido do centro do LCE (estado 6), foram resolvidos sistemas iguais ao 2.6 exceto pela k-ésima equação, que se torna  $t_k = 0$ . Os 11 sistemas desse formato (um para cada valor de k) foram resolvidos para a obtenção do valor de  $t_6$  para cada k. Para resolver esses sistemas, assim como aqueles para as distribuições estacionárias de probabilidade (equação 2.3), foi utilizado o algoritmo Gauss Compacto (FRANCO, 2006) implementado no mesmo programa.

Uma vez que todos os valores utilizados eram para a posição inicial 6  $(t_6)$ , o índice *i* da notação  $t_i$  se torna redundante e será omitido. Por outro lado, se faz necessário o acréscimo de um novo índice *k* para indicar o sistema do qual o valor foi obtido. Para evitar confusões entre  $t_i$  e  $t_k$ , será utilizada a notação  $t^{(k)}$ . Portanto o valor  $t^{(k)}$  se refere à quantidade média de transições realizadas pelos ratos para atingir o estado *k* pela primeira vez, tendo partido do estado 6. Os valores encontrados foram apresentados em alguns congressos (BOSCO et al., 2012; ARANTES et al., 2013; ARANTES et al., 2013b) e serão expostos e discutidos na seção de resultados (2.4).

Cabe ainda relatar que, mediante observação dos resultados, decidiu-se representar estes índices através de gráficos do tipo "box-plot". Este tipo de gráfico representa cada grupo por uma caixa com uma divisão, barras acima e abaixo dela e, em alguns casos, pontos fora da barra. A linha dentro da caixa representa a mediana dos valores, ou seja, um valor tal que metade dos valores observados são maiores que ele e a outra metade menores. Os dois limites desta caixa representam o primeiro e terceiro quartis, ou seja, valores que separam cada metade novamente ao meio. As barras externas marcam o último valor cuja distância seja menor que 1,5 vezes o tamanho da caixa, valores fora dessa região são marcados com círculos, caso existam.

# 2.4 Resultados e Discussão

As matrizes estocásticas estimadas para os grupos descritos na tabela 2.1 são apresentadas nas figuras 2.3 - 2.12. Nestas figuras, estão apresentados também os resultados do teste  $\chi^2$  de independência, através do destaque (em negrito) dos pares de probabilidades onde foram observadas tendência. Nestes casos, a transição preferida está assinalada com <sup>#</sup> para p < 0, 1, <sup>\*</sup> para p < 0, 5, <sup>\*\*</sup> para p < 0, 01 e <sup>\*\*\*</sup> para p < 0, 001.

No grupo tratado com a droga ansiolítica CDP não houve nenhuma tendência para um dos sentidos, conforme pode ser visto na figura 2.3. Para o outro grupo ansiolítico, MDZ, cuja matriz está apresentada na figura 2.4, foi observada forte preferência do rato passar para a posição 3 quando estava na 2 (p < 0,0001) e uma tendência mais fraca de transitar da posição 10 para a 9 (p < 0,05). Para o grupo de todos os ansiolíticos, cuja matriz está apresentada na figura 2.5, foi observada uma leve tendência na transição de 2 para 3 (p < 0,1). Esses resultados confirmam o que foi observado em Tejada et al. (2010), mostrando que os ratos submetidos às drogas ansiolíticas, se comportam aproximadamente como um passeio aleatório simples simétrico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 50	0	0, 50	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 51	0	0, 49	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 51	0	0, 49	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,57	0	0, 43
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.3: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiolítica CDP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,15	0	$0,\!85^{***}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 41	0	0, 59	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0,47	0	0, 53	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	$0,\!65^*$	0	0,35
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.4: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiolítica MDZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com \* para p < 0,05 e com \*\*\* para p < 0,001.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	$0,\!37$	0	$0,\!63^{\#}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 49	0	0, 51	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 50	0	0, 50	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 44	0	0, 56	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 60	0	0,40
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.5: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos ansiolítico, composto pelos grupos CDP e MDZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com  $^{\#}$  para p < 0, 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,32	0	$0,\!68^{**}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 45	0	0, 55	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	$0,\!30$	0	$0,\!70^{**}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 42	0	0, 58	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 55	0	0,45
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.6: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo controle. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>\*\*</sup> para p < 0,01.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,36	0	$0,\!64^*$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,47	0	0, 53	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 45	0	0, 55	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,29	0	$0,\!71^{**}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0,47	0	0,53	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 50	0	0, 50	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,57	0	0, 43
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.7: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos ansiogênico, composto pelos ratos tratados com SCZ e PTZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com \* para p < 0,05 e \*\* para p < 0,01.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 \
2	0,31	0	$0,\!69^{***}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 45	0	0, 55	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 45	0	0, 55	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,30	0	$0,70^{**}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 43	0	0,57	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 47	0	0, 53	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0,47	0	0, 53	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,58	0	0, 42
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.8: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiogênica SCZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>\*\*</sup> para p < 0,01 e com <sup>\*\*\*</sup> para p < 0,001.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,38	0	$0,62^{\#}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,47	0	0, 53	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 45	0	0, 55	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 29	0	$0,\!71^{**}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 51	0	0, 49	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,57	0	0, 43
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.9: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiogênica PTZ, composto pelos ratos tratados com qualquer dose desta droga. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>#</sup> para p < 0, 1 e <sup>\*\*</sup> para p < 0, 01.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,38	0	$0,\!62^{\#}$	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,47	0	0, 53	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 51	0	0, 49	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 47	0	0,53	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,31	0	$0,\!69^{***}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 50	0	0, 50	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 56	0	0,44
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.10: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com 10mg da droga ansiogênica PTZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>#</sup> para p < 0, 1 e com <sup>\*\*\*</sup> para p < 0, 001.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0,40	0	0,60	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 47	0	0, 53	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0,47	0	0, 53	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	$0,\!28$	0	$0,\!72^{**}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 52	0	0, 48	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,58	0	0,42
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.11: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com 20mg da droga ansiogênica PTZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>\*\*</sup> para p < 0,01.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( - )	_	_	_	_	_	_	_	_	_	- )
2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 50	0	0, 50	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	$0,\!375$	0	$0,\!625^{\#}$	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0,29	0	$0,\!71^{**}$	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,24	0	$0,\!76^{***}$	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 44	0	0, 56	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 46	0	0,54	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 52	0	0, 48	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,54	0	0,46
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura 2.12: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com 30mg da droga ansiogênica PTZ. Valores em negrito indicam posições em que existe preferência para um dos sentidos da movimentação. Assinalados com <sup>#</sup> para p < 0, 1, <sup>\*\*</sup> para p < 0, 01 e com <sup>\*\*\*</sup> para p < 0, 001.

Também foi encontrada uma tendência da posição 2 para a posição 3 para os grupos ansiogênicos: SCZ (p < 0,0001), apresentado na figura 2.8; PTZ10 (p < 0,1), na figura 2.10; PTZ (p < 0,1), na figura 2.9; e Ansiogênico (p < 0,05), na figura 2.7. O grupo controle, apresentado na figura 2.6 também apresentou a mesma preferência (p < 0,01). De forma geral, esses resultados estão de acordo com o que se conhece do comportamento de ratos no LCE, uma vez que a posição 2, juntamente com a posição 1, ambas no braço aberto, são as mais aversivas do aparato.

Alguns grupos também apresentaram uma tendência neste sentido, da posição 6 para a posição 7, ou seja, da posição central para a primeira posição do braço fechado. Essa preferência apareceu para os grupos PTZ10 (p < 0,0001), apresentado na figura 2.10; PTZ20 (p < 0,01), na figura 2.11; PTZ30 (p < 0,001), na figura 2.12; PTZ(p < 0,01), na figura 2.9; SCZ (p < 0,01), na figura 2.8; e Ansiogênico (p < 0,01), na figura 2.7. Novamente, o grupo controle, figura 2.6, apresentou a mesma propensão (p < 0,01) que os grupos ansiogênicos.

Por fim, o grupo PTZ30, figura 2.12, apresentou uma preferência, quando na posição 4, de ir para a posição 5 (p < 0, 1) e, quando na 5 de ir para a 6 (p < 0, 01).

#### 2.4.1 Distribuição de Probabilidade Estacionária

A figura 2.13 mostra a distribuição de probabilidades estacionária calculada para cada estado nos grupos controle, ansiolítico e ansiogênico. A curva para o grupo controle não está entre as outras duas, mas ela se encontra mais próxima do grupo ansiogênico. Apesar disso, nota-se que, próximo ao centro, a curva para o grupo controle apresenta uma inclinação intermediária às inclinações das outras duas curvas.

Fazendo o mesmo para os subgrupos ansiogênicos obtêm-se a figura 2.14 onde o mesmo comportamento das curvas é observado. Ou seja, suas inclinações próximas do centro são maiores para os grupos dos quais se espera um comportamento de tipo mais ansioso, o que pode ser notado comparando as curvas para doses diferentes de PTZ.

Os valores calculados para os subgrupos ansiolíticos são mostrados na figura



Figura 2.13: Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga.



Figura 2.14: Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga ansiogênica.



Figura 2.15: Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga ansiolítica.

2.15. Comparando mais uma vez as inclinações próximas do centro, percebe-se que esta é menor no grupo tratado com 5mg de CDP do que no grupo tratado com 1mg de MDZ.

Baseados nestas observações foram calculados os valores das inclinações próximas ao ponto central (estado 6). Uma vez que os estados são valores discretos, o que é chamado de inclinação aqui é a diferença entre os valores calculados para dois estados vizinhos ( $\pi_i - \pi_{i-1}$ , por exemplo  $\pi_6 - \pi_5$ ). Estas inclinações, calculadas para todos os grupos são apresentadas na figura 2.16. Comparando-se as duas primeiras barras do gráfico (CDP e MDZ), observa-se que os valores calculados para o CDP são menores que aqueles encontrados para o MDZ em todas as posições. Ou seja, grupos com comportamento de tipo menos ansioso apresentam valores menores para a inclinação, como aparentavam as figuras anteriores (2.13, 2.14 e 2.15). Esta mesma ordenação pode ser observada para as três doses de PTZ, ou seja, valores maiores para doses maiores da droga que gera comportamentos de tipo mais ansioso. Para os grupos ansiolítico, controle e ansiogênico essa ordenação só ocorre para  $\pi_6 - \pi_5$ .



Figura 2.16: Diferença das probabilidades estacionárias de estados vizinhos, próximos ao centro do LCE, para cada grupo. A ordem das barras (da esquerda para a direita) é a mesma que a da legenda (de cima para baixo).

para os estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto). Por isso, essa inclinação foi escolhida como candidata a representar o nível de ansiedade do rato.

Até este ponto, todos os cálculos foram realizados sobre as matrizes de grupos de ratos. Uma vez escolhida a medida candidata a índice de ansiedade, faz-se necessário calcular seu valor para cada rato, para que seja possível levar em consideração a dispersão dos valores ao comparar dois grupos. Este cálculo foi realizado, e seus valores foram representados em gráficos do tipo "box-plot". O último parágrafo da seção 2.3 apresenta uma breve explicação sobre esse tipo de gráfico.



Figura 2.17: Diferença das probabilidades estacionárias dos estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto) para cada tipo de droga.

A figura 2.17 mostra, os valores calculados para os ratos dos grupos controle, ansiolítico e ansiogênico. Pode-se notar nela que as únicas ocorrências de valores negativos são observadas no grupo ansiolítico. Os subgrupos ansiolíticos são representados na figura 2.18 e os ansiogênicos na figura 2.19. Na primeira (figura 2.17) nota-se que o grupo ansiolítico apresenta uma separação razoável dos demais grupos, enquanto os outros dois apresentam muita interseção. Comparando-se os dois grupos ansiolíticos (figura 2.18) nota-se ainda uma separação razoável entre eles, uma vez que a mediana de cada grupo se encontra fora da região englobada pela caixa do outro grupo. Porém, para os subgrupos ansiogênicos (figura 2.19) nenhuma separação é observada.

Outro ponto a ser observado, na figura 2.18 é que, ela aponta para a hipótese de que os ratos tratados com 5mg de CDP apresentam comportamentos de tipo menos ansioso do que aqueles tratados com 1mg de MDZ.

Esta diferença entre as probabilidades estacionárias de dois estados, pode ser interpretada como a medida de quanto o rato prefere uma posição do LCE ao invés da



Figura 2.18: Diferença das probabilidades estacionárias dos estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto) para cada tipo de droga ansiolítica.



Figura 2.19: Diferença das probabilidades estacionárias dos estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto) para cada tipo de droga ansiogênica.

outra. A melhor separação foi encontrada ao comparar os estados 5 e 6, justamente os estados relacionados com entradas nos braços abertos. Isto é interessante porque estes mesmo estados (que representam a posição central e a primeira posição dos braços abertos) são relacionados às medidas tradicionais. O número de entradas nos braços abertos, por exemplo, é a quantidade de transições feitas pelo rato do estado 6 para o estado 5. A ocorrência de valores negativos para alguns ratos do grupo ansiolítico, mostra uma preferência destes pelo inicio do braço aberto, em detrimento à posição central.

#### 2.4.2 Tempos Médios de Primeira Visita

Foram calculadas as quantidades médias de transições feitas pelos grupos de ratos para atingir pela primeira vez o estado k tendo partido da posição central do LCE (chamada de "tempos médios de primeira visita" ao estado k partindo do estado 6). Isto foi feito conforme explicado na seção 2.3, onde este valor foi denotado  $t^{(k)}$ .

A figura 2.20 mostra este tempo calculado para cada estado no grupo controle, no grupo de ratos tratados com drogas ansiolíticas e no daqueles tratados com drogas ansiogênicas. Pode-se notar que o grupo ansiogênico apresenta tempos maiores do que o ansiolítico para atingir uma posição no braço aberto. Essa relação se inverte para as posições do braço fechado. Nota-se também que os valores para o grupo ansiogênico ficam entre os valores para os outros dois grupos, mas bem mais próximos dos valores do grupo controle que do ansiolítico.

A figura 2.21 mostra este tempo calculado para cada estado no grupo ansiogênico, juntamente com os seus subgrupos SCZ e PTZ, bem como para cada dose de PTZ. Comparando as três doses de PTZ, percebe-se que quanto maior a dose maior o tempo médio de primeira visita às posições no braço aberto. Ou seja, assim como na figura 2.20 (desconsiderando o grupo controle) quanto mais tipo ansioso for o comportamento esperado maior será o tempo médio de primeira visita às posições do braço aberto. Ao observar-se os valores calculados para o braço fechado, esta ordem se inverte.



Figura 2.20: Tempo médio de primeira visita, calculados a partir do modelo que desconsidera as fugas, para os grupos ansiolítico, controle e ansiogênico.



Figura 2.21: Tempo médio de primeira visita, calculados a partir do modelo que desconsidera as fugas, para os grupos tratados com cada uma das dosagens de pentilenotetrazol, a união desses três, os tratados com semicarbazida e a união dos dois últimos.



Figura 2.22: Tempo médio de primeira visita, calculados a partir do modelo que desconsidera as fugas, para os grupos tratados com clordiazepox, midazolam e a união dos dois grupos.

Ao comparar o tempo médio de primeira visita aos estados do braço aberto obtidos para cada dose de PTZ com os valores obtidos para SCZ (20mg), observa-se que estes ficam entre os valores obtidos para 20mg e 30mg de PTZ. Ou seja, 20mgde SCZ gera um comportamento de tipo mais ansioso do que a mesma dose de PTZ, embora não tão forte como aquele provocado por 30mg de PTZ. Isto sugere que a SCZ gere mais ansiedade que o PTZ.

Nota-se ainda, a inexistência de valores para o grupo tratado com 30mg de PTZ na posição extrema do braço aberto, isso ocorreu porque nenhum rato deste grupo atingiu a última posição do braço aberto, conforme pode ser observado também na matriz de probabilidades de transição deste grupo.

A figura 2.22 apresenta os tempos médios de primeira visita para o grupo dos ratos tratados com drogas ansiolíticas juntamente com os seus subgrupos, os tratados com CDP e com MDZ. É interessante notar que os maiores tempos para posições nos braços abertos são observados no grupo tratado com MDZ, enquanto aquele tratado com CDP apresentou valores menores. Isto parece indicar que valores menores estão mais relacionados com a diminuição de comportamentos de tipo ansioso.

Uma última característica notada nos gráficos é que, para qualquer grupo, os tempos calculados para uma posição a determinada distância do centro do LCE em um braço aberto, são sempre maiores que os tempos para a posição do braço fechado que se encontra a essa mesma distância. E como já dito nos parágrafos anteriores, essa diferença parece diminuir quanto menos tipo ansioso for o comportamento esperado para o grupo para o qual ela é calculada.

#### 2.4.2.1 Indice de Ansiedade Proposto

Os gráficos anteriores (figuras 2.20, 2.21 e 2.22) representam os tempos calculados com as matrizes de cada grupo, que servem para dar uma ideia geral do comportamento daquele grupo e, guiar as observação para as características citadas.

A partir destas observações supõe-se que a relação entre os tempos calculados para duas posições equidistantes do centro forneça uma forma de mensuração do nível de ansiedade do grupo. A medida escolhida para estudo deveria, portanto relacionar esse par de tempos para cada distância. Além disso, ela deveria ser independente da escala, ou seja, o aumento de um percentual fixo para ambos os tempos não deveria alterar a medida proposta. Por fim, seria desejável que a medida ficasse restrita a um intervalo de valores.

Com base nesses requisitos, foi escolhida como medida a razão entre tempos médios para cada distância. O último requisito foi parcialmente satisfeito determinando que o numerador deveria ser o tempo médio para o braço fechado e o denominador o tempo médio para o braço aberto. Como os tempos médios para braços abertos são, geralmente, maiores do que aqueles para os braços fechados, essa medida geralmente, mas não sempre, ficaria entre 0 e 1, sendo maior para os grupos mais ansiolíticos. Matematicamente: se  $t^{(k)}$  é o tempo médio de primeira visita ao estado k começando no centro e,  $I_d$ , d = 1, 2, 3, 4, 5 representar nosso índice para a distância d do centro, então  $I_d = \frac{t^{(d+6)}}{t^{(6-d)}}$ .

Uma vez definida esta proposta, os cálculos passaram a ser realizados sobre as

matrizes de cada rato, para que fosse possível a comparação estatística, tanto entre diferentes distâncias quanto entre diferentes grupos. A primeira abordagem para o estudo estatístico seguiu os procedimentos mais comumente utilizados, partindo dos cálculos de médias ( $\mu$ ) e desvios padrões ( $\sigma$ ). Tais valores são largamente utilizados nas comparações entre grupos que possuem distribuição normal, o que geralmente ocorre com a maioria das medidas estudas. Porém nesta etapa foram encontrados desvios padrões maiores do que as médias ( $\sigma > \mu$ ).

Uma vez que os valores de  $I_d$  são sempre positivos e a definição de distribuição normal nos garante que o desvio padrão ao ser subtraído da média  $(\mu - \sigma)$  nunca levará a um valor menor do que o mínimo observado, deve-se descartar a hipótese de distribuição normal para os valores de  $I_d$ . Por isso decidimos utilizar o métodos de comparação por postos de Friedman (SIEGEL, 2006). Por este motivo também, foi decidido que as médias e desvios padrões não tem relevância para serem apresentadas neste trabalho, optando-se por apresentar os dados através de gráficos do tipo "boxplot".

A figura 2.23 mostra os valores encontrados para cada distância do centro nos ratos do grupo controle. Observando esta figura, nota-se que estes índices são aproximadamente iguais para as diferentes distâncias do centro. Esta observação foi comprovada ao se aplicar o método de comparação por postos de Friedman (SIE-GEL, 2006) com nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

Os mesmo cálculos realizados para os ratos tratados com drogas ansiolíticas tem seus resultados apresentados na figura 2.24. A mesma observação feita para o grupo controle pode ser feita aqui e, o mesmo teste lá aplicado comprova esta observação.

Para os ratos tratados com drogas ansiogênicas os resultados são apresentados na figura 2.25. Apesar de visualmente não parecer existir diferença entre os valores para diferentes distâncias, o teste aplicado não comprova esta observação visual.

Tomando-se o valor calculado para as posições mais próximas do centro  $(I_1)$ , que foram escolhidas por serem atingidas pela maioria dos ratos, obtêm-se a figura 2.26. A partir dela pode-se notar que os valores encontrados para o grupo ansiolítico são diferentes daqueles encontrados para os outros dois grupos, embora tal diferenciação



Figura 2.23: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados que se encontram à mesma distância do centro, calculadas para cada rato do grupo controle a partir do modelo que desconsidera as fugas.



Figura 2.24: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados que se encontram à mesma distância do centro, calculadas para cada rato do grupo ansiolítico a partir do modelo que desconsidera as fugas.



Figura 2.25: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados que se encontram à mesma distância do centro, calculadas para cada rato do grupo ansiogênico a partir do modelo que desconsidera as fugas.

não exista entre os grupos controle e ansiogênico. Uma vez que o grupo ansiogênico inclui o registro de ratos tratados com dose de PTZ baixa demais para produzir efeito (10mg/Kg), conforme foi observado ao final da seção 2.2.1, a incapacidade do índice  $I_1$  em separar os grupos controle e ansiogênico não chega a ser preocupante. Por outro lado, sua eficácia de separar entre os grupos controle e ansiolítico é bastante desejável.

Esta separação aparece também ao serem comparados os ratos tratados com cada tipo de droga ansiolítica, conforme pode ser observado na figura 2.27, onde as diferenças nas medidas ficam bastante evidentes. Como era esperado, devido às observações anteriores, pode-se notar que os maiores valores foram encontrados para o grupo tratado com a droga ansiolítica CDP. Tal separação foi comprovada pelo teste de permutação exato (SIEGEL, 2006) com nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

A figura 2.28 mostra esses valores para todos os grupos de ratos tratados com drogas ansiogênicas. Pode-se observar nela um ordenamento dos valores obtidos para os grupos tratados com cada dose de PTZ. Este ordenamento atribui os maiores



Figura 2.26: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados vizinhos do centro, calculadas para cada rato dos grupos controle, ansiolítico e ansiogênico a partir do modelo que desconsidera as fugas.

valores aos grupos tratados com menores doses de PTZ, o que sugere mais uma vez que valores mais baixos para esta medida apontam para comportamentos de tipo mais ansioso.

O resultado mais importante é que, para cada grupo farmacológico, os índices foram aproximadamente iguais para todas as distâncias do centro. Isto sugere que apenas um dos índices  $(I_1)$  seja usado para caracterizar a condição farmacológica do animal, o que elimina o problema de algum grupo de ratos não atingir determinada posição.


Figura 2.27: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados vizinhos do centro, calculadas para cada rato de cada subgrupo ansiolítico a partir do modelo que desconsidera as fugas.



Figura 2.28: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados vizinhos do centro, calculadas para cada rato de cada subgrupo ansiogênico a partir do modelo que desconsidera as fugas.

# Capítulo 3

## Modelagem a Tempo Contínuo

Neste capítulo é apresentada uma modelagem que considera a quantidade de tempo que os ratos passaram em cada uma das 11 posições em que o LCE foi reduzido. Esta abordagem do problema foi apresentada antes no evento (ARANTES et al., 2015). A seção 3.1 expõe os conceitos de processo de Poisson e processo markoviano a tempo contínuo, utilizados em tal modelagem, de forma bem direta e intuitiva, sem as demonstrações que normalmente acompanham os resultados da área. Além do uso imediato desses conceitos e resultados nesta tese, também se pretende fazer com que os conceitos possam ser entendidos por pesquisadores das mais diversas áreas, e contribuir assim para a disseminação do conhecimento.

Na seção 3.2 é apresentado o modelo markoviano a tempo contínuo com espaço de estados formado pelas mesmas 11 posições nas quais o labirinto foi dividido para o modelo discreto. A divisão do LCE nas suas 11 posições, bem como as transições possíveis, pode ser relembrada na figura 2.1 e os ratos utilizados na tabela 2.1, ambos no capítulo 2. Na seção 3.3 as matrizes de taxas e suas probabilidades estacionárias são comparadas às probabilidades estacionárias para o modelo discreto, tanto às apresentadas no capítulo anterior quanto àquelas apresentadas por Tejada et al. (2010).

### 3.1 Processo de Poisson e Processo Markoviano a Tempo Contínuo

O processo de Poisson é um elemento fundamental na construção de um processo Markoviano a tempo contínuo e é apresentado aqui por ser mais simples e trazer muita intuição para o entendimento do mesmo (LAWLER, 2006). Um exemplo interessante para introduzir o processo de Poisson é o processo estocástico formado pelo número de clientes atendidos em uma loja ou banco ao longo do tempo. Seja  $X_t$  o número de clientes atendidos até o tempo t. Assumem-se três hipóteses sobre a taxa com que os clientes chegam na loja ou no banco. A primeira hipótese é que o número de clientes que chega durante um intervalo de tempo não afeta a quantidade de clientes que chegará em outro subsequente intervalo de tempo. Matematicamente falando, para  $s_1 \leq t_1 \leq s_2 \leq t_2 \leq \cdots \leq s_n \leq t_n$ , essa hipótese diz que as variáveis aleatórias,  $X_{t_1} - X_{s_1}, \cdots, X_{t_n} - X_{s_n}$ , que contam o número de clientes que chegam em intervalos disjuntos de tempo, são independentes. A segunda hipótese é que a taxa média, com a qual os clientes chegam, é constante. A taxa de chegada será denotada por  $\lambda$ , ou seja, em média são esperados  $\lambda t$  clientes durante um intervalo de tamanho t. Em um intervalo pequeno de tempo  $[t, t + \Delta t]$ , é esperado que um novo cliente chegue com probabilidade  $\lambda \Delta t$ . A terceira hipótese estabelece que a probabilidade de mais de um cliente chegar durante um pequeno intervalo de tempo é significativamente pequena. Um processo estocástico  $X_t$ , com  $X_0 = 0$  e t o tempo assumindo valores no conjunto dos números reais não-negativos, que satisfaz essas três condições é chamado de processo de Poisson de taxa  $\lambda$ .

É bastante conhecido, por isso não será deduzido aqui, que a variável aleatória  $X_t$  tem distribuição de Poisson de parâmetro  $\lambda t$ , ou seja,

$$\mathbb{P}(X_t = k) = e^{-\lambda t} \frac{(\lambda t)^k}{k!}, k = 0, 1, 2, \cdots$$

Por outro lado, os tempos esperados,  $T_n, n = 1, 2, \cdots$ , entre as chegadas do (n-1)-ésimo e do *n*-ésimo clientes tem distribuição exponencial de parâmetro  $\lambda$ , e portanto o tempo médio para chegada de um cliente é  $1/\lambda$ . É intuitivo que essas variáveis aleatórias sejam independentes e identicamente distribuídas, e tenham a propriedade de perda de memória. Essa propriedade exige que se forem esperadas

s unidades de tempo para a chegada de um cliente e não chegou nenhum, a probabilidade de um cliente chegar nas próximas t unidades de tempo é exatamente a mesma. Matematicamente,

$$\mathbb{P}(T_i \ge s + t | T_i \ge s) = \mathbb{P}(T_i \ge t)$$

A distribuição de probabilidade exponencial obedece exatamente essa propriedade.

Sejam n variáveis aleatórias exponenciais,  $T_1, \dots T_n$ , independentes e de parâmetros  $b_1, \dots b_n$ , respectivamente. Intuitivamente podem ser consideradas como n relógios cujos alarmes irão tocar nos tempos  $T_1, \dots T_n$  respectivamente. É possível mostrar que a distribuição de probabilidade da variável aleatória  $T = \min\{T_1, \dots T_n\}$ , que é o tempo que leva para o primeiro alarme tocar, é uma distribuição de probabilidade exponencial de parâmetro  $b_1 + \dots + b_n$ , e que a probabilidade do alarme itocar primeiro é  $b_i/(b_1 + \dots + b_n)$ .

Agora suponha um espaço de estados finito, S, onde é definido o processo estocástico a tempo contínuo  $X_t$  que obedece a propriedade de Markov,

$$\mathbb{P}(X_t = y | X_r, 0 \le r \le s) = \mathbb{P}(X_t = y | X_s),$$

ou seja a probabilidade do processo assumir o estado y no tempo t só depende do que aconteceu no tempo s, não dependendo do que aconteceu no passado  $(0 \le r \le s)$ . E suponha que seja homogêneo no tempo,

$$\mathbb{P}(X_t = y | X_s = x) = \mathbb{P}(X_{t-s} = y | X_0 = x)$$

Para cada  $x, y \in S, x \neq y$  é associada uma taxa de transição,  $q_{x,y}$ , do estado xpara o estado y. A taxa  $q_x$  é a taxa total com que o processo sai do estado x, para qualquer outro estado y ao qual ele tem acesso. Pode-se pensar que para cada estado  $x \in S$ , há um processo de Poisson a ele associado de taxa  $q_x$ , e que o tempo de permanência nesse estado é regido por uma variável aleatória exponencial de parâmetro  $q_x$ . Como foi visto acima, o tempo médio de saída do estado x será então  $1/q_x$ . Além disso, pode-se pensar que cada estado  $y_1, y_2, \dots y_m$  para os quais xpode "pular" está associado a um relógio de taxa  $q_{x,y_i}$ , que pode disparar a qualquer momento. Como também foi visto acima, no processo de Poisson, o tempo T, até um dos alarmes tocar, é uma variável aleatória exponencial de parâmetro  $q_x = q_{x,y_1} + q_{x,y_2} + \cdots + q_{x,y_m}$ , que rege o tempo de saída do estado x. Essa mesma lógica se segue para os demais estados, e toda essa informação pode ser resumida em uma matriz, que aqui será chamada de matriz das taxas,  $\mathbf{Q}$ . Na linha i dessa matriz estão as taxas com que o processo "pula" do estado i para os demais estados com que se liga. O elemento da diagonal principal,  $q_{i,i}$ , é o valor negativo da soma das demais taxas, pois  $\mathbf{Q}$  tem a propriedade dos elementos de cada linha somarem zero, fato decorrente de uma dedução matemática que foge do escopo deste trabalho.

Como exemplo, pode-se considerar um espaço de estados finito com três estados,  $S = \{1, 2, 3\}$ , e a matriz das taxas pode ser da forma abaixo.

$$\mathbf{Q} = \begin{pmatrix} -q_1 & q_{1,2} & q_{1,3} \\ q_{2,1} & -q_2 & q_{2,3} \\ q_{3,1} & q_{3,2} & -q_3 \end{pmatrix},$$

onde  $q_1 = q_{1,2} + q_{1,3}$ ,  $q_2 = q_{2,1} + q_{2,3}$  e  $q_3 = q_{3,1} + q_{3,2}$ .

Assim como no caso discreto,  $\mathbf{Q}$  tem uma distribuição estacionária,  $\mu$ , que pode ser calculada a partir da expressão matricial  $\mu \mathbf{Q} = 0$ , cuja dedução pode ser encontrada na literatura (DURRETT, 2009).

A partir da matriz  $\mathbf{Q}$  pode-se encontrar o chamado esqueleto discreto,  $Y_n$ , do processo Markoviano a tempo contínuo, que só leva em conta as transições e não mais o tempo passado em cada estado. Como descrito acima, o processo "pula" do estado x para um estado  $y_i$  quando o alarme associado ao estado  $y_i$   $(q_{x,y_i})$  "toca". Isso ocorre com probabilidade  $q_{x,y_i}/(q_{x,y_1} + q_{x,y_2} + \cdots + q_{x,y_m})$ , que é a probabilidade de transição do estado x para o estado  $y_i$ . Repetindo esse raciocínio para os demais estados e colocando valor zero nas diagonais<sup>1</sup>, tem-se uma matriz estocástica,  $\mathbf{P}$ , de uma cadeia de Markov a tempo discreto. Para o exemplo de 3 estados acima teríamos

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Poderia-se colocar qualquer outro valor para  $p_{x,x}$  desde que sejam iguais para todo x.

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} 0 & q_{1,2}/q_1 & q_{1,3}/q_1 \\ \\ q_{2,1}/q_2 & 0 & q_{2,3}/q_2 \\ \\ q_{3,1}/q_3 & q_{3,2}/q_3 & 0 \end{pmatrix}$$

Para essa cadeia também pode-se encontrar uma distribuição estacionária, que será denotada por  $\pi$ , que como foi visto no capítulo 2, é obtida através da equação matricial  $\pi \mathbf{P} = \pi$ . Existe, contudo, uma forma de relacionar  $\pi \in \mu$ , que será descrita a seguir. O primeiro fato a ser observado é que a distribuição de probabilidade  $\pi$  será uma distribuição estacionária para  $Y_n$  se e somente se  $\mu_x$  for proporcional a  $\pi_x/q_x$  para todo  $x \in S$ , e for uma distribuição estacionária para  $X_t$ . Intuitivamente, essa correção é devida aos tempos de espera nos respectivos estados. Por exemplo, se forem observadas 1000 transições no processo a tempo contínuo, o esqueleto  $Y_n$  assumiria  $\pi_x \times 1000$  vezes o estado x. Contudo, o processo fica em média  $1/q_x$  unidades de tempo nesse estado. Logo, no estado de equilíbrio que a medida estacionária  $\mu$  representa, o processo permanece, em média,  $\pi_x \times 1000 \times 1/q_x$  nesse estado. Seguindo o mesmo raciocínio para os demais estados de S encontra-se o tempo médio total decorrido nas 1000 transições. Para o exemplo acima, onde  $S = \{1, 2, 3\}$ , esse tempo médio seria 1000  $\times (\pi_1/q_1 + \pi_2/q_2 + \pi_3/q_3)$ . E portanto, a proporção de tempo que o processo passa no estado  $i \in S = \{1, 2, 3\}$  seria  $\mu_i$ , ou seja

$$\mu_i = \frac{\pi_i/q_i}{\pi_1/q_1 + \pi_2/q_2 + \pi_3/q_3}$$

Em um caso mais geral, mas com S finito, tem-se

$$\mu_x = \frac{\pi_x/q_x}{\sum_{y \in S} \pi_y/q_y}.$$

A distribuição estacionária  $\mu$  é mais próxima da realidade quando são tratados problemas que envolvem tempo de permanência nos estados.

### 3.2 Construção do Modelo

O modelo aqui proposto é formado pelos mesmos 11 estados do modelo anterior (capítulo 2) mas considerando agora o tempo que os animais passaram em cada uma das posições. A proposta é considerar a hipótese Markoviana, de que o animal só considera a posição atual para se decidir pela próxima posição. Tem-se assim uma cadeia ou processo de Markov a tempo contínuo, onde o animal fica em um estado *i* durante uma quantidade de tempo regida pela distribuição exponencial de probabilidade de parâmetro ou taxa  $q_i$ . Após esse intervalo de tempo, o animal vai para uma das posições possíveis, i - 1 ou i + 1. As exceções são os estados i = 1e i = 11, que apenas se ligam aos estados 2 e 10, respectivamente. Contudo, esses dois estados tem agora, com a introdução do tempo de permanência nos estados, uma característica diferente da que tinham na modelagem a tempo discreto, que possibilita uma análise mais detalhada do padrão de comportamento dos animais nessas posições extremas. Além disso, nesta modelagem não há mais o problema da periodicidade que, de certa forma, interferia na convergência para a distribuição estacionária.

Assim como no caso da modelagem a tempo discreto, as matrizes  $\mathbf{Q}$  para cada um dos tratamentos foram estimadas a partir do método da máxima verossimilhança, que, dada uma amostra, estabelece os seguintes estimadores para as taxas de transição entre os estados de um espaço S finito,

$$\hat{q}_{x,y} = \frac{N_{x,y}}{A_x},$$

onde  $N_{x,y}$  é o número de transições do estado x para o estado y até o tempo T, e  $A_i$  é o tempo total passado no estado x até o tempo T.

A partir da mesma amostra já descrita na seção 2.2, as matrizes de taxas foram estimadas primeiro para os grupos de ratos expostos às drogas ansiolíticas, ansiogênicas e para o grupo controle, e são apresentadas na seção seguinte (3.3). Um ponto importante a ser destacado é que a partir dessas matrizes podem ser recuperadas as matrizes dos esqueletos discretos, como foi visto na seção 3.1. Essas matrizes são exatamente aquelas apresentadas na seção 2.4. Nesse contexto, pode-se dizer que o modelo a tempo contínuo está mais próximo daquilo que realmente acontece na exploração do LCE, em relação ao modelo a tempo discreto que foi apresentado no capítulo 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	(-0, 18)	0, 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0, 17	-0,47	0, 29	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,68	-1, 39	0,71	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0,70	-1,40	0,70	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 34	-0,70	0, 36	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 20	-0,46	0, 26	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 32	-0,67	0, 35	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 58	-1, 18	0,60	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 66	-1,34	0,68	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 19	-0, 32	0, 13
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 21	-0,21

Figura 3.1: Matriz de taxas calculada para o grupo de ratos tratados com drogas ansiolíticas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	(-0, 23)	0,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0, 15	-0,46	0, 31	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 50	-1,08	0, 58	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 40	-0,89	0, 49	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 34	-0,74	0,40	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,09	-0, 30	0, 21	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 11	-0, 25	0, 14	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 23	-0, 48	0, 25	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 30	-0,62	0, 32	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 14	-0,26	0, 12
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 12	-0, 12

Figura 3.2: Matriz de taxas calculada para o grupo de ratos controle.

#### 3.3 Resultados e Discussão

As matrizes de taxas calculadas para os grupos ansiolítico, controle e ansiogênico são apresentadas nas figuras 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente.

Nas diagonais das matrizes, com valores negativos, estão as taxas com que as posições  $1, 2, \dots, 11$  são deixadas pelos animais. É importante notar que quanto maior a taxa associada a uma posição, menos tempo o animal permanece nessa posição. Para as três matrizes, e, especificamente, para as duas posições extremas, 1 e 11, temos taxas menores de transição. Uma hipótese que pode explicar esse resultado, é que nessa posição o animal chega ao fim dos braços e perde tempo ao

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	(-0, 21)	0, 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0 )
2	0, 16	-0,44	0,28	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 44	-0,94	0, 50	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0,47	-0,97	0, 50	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 28	-0,62	0, 34	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,06	-0,21	0, 15	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 12	-0,26	0, 14	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 23	-0,47	0, 24	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 32	-0,64	0, 32	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 16	-0,28	0, 12
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 14	-0, 14

Figura 3.3: Matriz de taxas calculada para o grupo de ratos tratados com drogas ansiogênicas.

girar o corpo para voltar para o centro, no caso do braço aberto, ou para manter-se alerta, no braço fechado, com a cabeça na direção da região central, ou mesmo para simplesmente voltar para o centro, e continuar sua exploração. Cada uma dessas possibilidades se relaciona com as fases de exploração do labirinto pelo animal. De maneira geral, no início estariam indo e vindo no labirinto, movidos pela curiosidade, e no final, estacionados nas zonas seguras, que os braços fechados representam. As taxas calculadas são médias calculadas a partir das trajetórias dos ratos, e essas fases influenciariam mais ou menos seus valores. Esta é uma desvantagem de se considerar o processo homogêneo no tempo, ou seja, de que as taxas de transição não mudam ao longo do tempo.

Analisando especificamente, a matriz das taxas para o grupo ansiolítico, observase que  $q_1 = 0, 18$  e  $q_{11} = 0, 21$ , o que indicaria que o animal passa mais tempo na posição 1 do que na posição 11. Contudo, pode-se pensar que haveria mais disponibilidade dos animais desse grupo, de sair da área segura que a última posição do braço fechado representa. Já para o grupo ansiogênico, com  $q_1 = 0, 21$  e  $q_{11} =$ 0, 14, ao contrário do grupo anterior, seus membros tem em média mais disposição de sair da última posição do braço aberto, do que da última posição do braço fechado, o que parece bastante natural para seu padrão esperado de comportamento. E por fim, com  $q_1 = 0, 23$  e  $q_{11} = 0, 12$ , o grupo controle segue o mesmo comportamento do grupo ansiogênico.

Estado	Ansiolítico	Controle	Ansiogênico
1	0,18	0,23	0,21
2	$0,\!47$	$0,\!46$	0,44
3	1,39	$1,\!08$	0,94
4	1,40	$0,\!89$	0,97
5	0,70	$0,\!74$	0,62
6	0,46	$0,\!30$	0,22
7	0,67	$0,\!25$	0,26
8	1,18	$0,\!48$	0,47
9	1,34	$0,\!62$	0,64
10	0,32	0,26	0,28
11	0,21	$0,\!12$	0,14

Tabela 3.1: Taxas de saída de cada estado.

As taxas de saída da posição 2 são bastante interessantes, pois são praticamente o dobro das taxas de saída da posição 1, para todos os grupos. Para o grupo ansiolítico, observa-se que  $q_2 = 0, 47$ , enquanto, para para o grupo ansiogênico, temse  $q_2 = 0, 44$ , e para o o grupo controle, essa taxa vale  $q_2 = 0, 46$ . Esses valores representam mais de perto a tendência de saída dos braços abertos, para qualquer um dos grupos.

Na tabela 3.1 vemos que, para o grupo ansiolítico, há uma certa simetria entre as taxas de saída das posições 5 e 7, 4 e 8, 3 e 9, 2 e 10, que pode ser melhor visualizada no gráfico da figura 3.4. Esse padrão não se repete para os grupos ansiogênicos e controle, cujas taxas são maiores dentro do braço aberto em relação ao braço fechado, ou seja:  $q_2 > q_{10}$ ,  $q_3 > q_9$ ,  $q_4 > q_8$  e  $q_5 > q_7$ .

As taxas da posição 6, posição central, também são bastante interessantes pois diferenciam os grupos. Tem-se  $q_6 = 0, 30$ , para o grupo controle,  $q_6 = 0, 46$  para o grupo ansiolítico, e  $q_6 = 0, 22$ , para o grupo ansiogênico. Portanto, os ratos do grupo ansiogênico saem, com menor frequência, do estado 6, em relação ao grupo



Figura 3.4: Taxas de saída de cada estado.

ansiolítico, com o grupo controle se situando entre os dois grupos.

As taxas de saída das posições dos braços fechados são visivelmente maiores para o grupo ansiolítico do que são para os dois outros grupos. Isso indica uma grande tendência dos ratos desse grupo deixarem uma área considerada segura, tendência essa, que os ratos dos demais grupos não apresentam. Já nos braços abertos, observa-se que as taxas de saída das posições 3 e 4 são maiores para os grupos ansiolíticos em relação aos dois outros grupos, mostrando como o grupos ansiolítico e controle se diferenciam bastante em comportamento. A separação entre os grupos ansiolíticos e controle é bastante importante para o desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas, pois propiciaria uma redução na quantidade de ratos necessários para o grupo controle nos testes das mesmas, uma vez que o modelo poderia gerar novos dados de exploração para ratos virtuais deste grupo.

Como foi visto na seção 3.1, a partir das taxas de saída de cada estado,  $q_i$ , podese calcular o tempo médio de permanência nesses estados, antes de uma transição para uma outra posição possível, que seria  $1/q_i$ . Esses valores são apresentados na tabela 3.2. Todas as observações feitas a partir da tabela 3.1, observando as taxas de saída, agora podem ser refeitas, observando os tempos médios de permanência

Estado	Ansiolítico	Controle	Ansiogênico
1	5,530	$4,\!395$	4,718
2	2,140	2,185	2,288
3	0,718	0,922	$1,\!064$
4	0,714	1,119	$1,\!027$
5	1,426	$1,\!359$	$1,\!603$
6	2,162	$3,\!326$	4,652
7	$1,\!483$	$3,\!992$	$3,\!887$
8	$0,\!847$	$2,\!098$	$2,\!124$
9	0,746	$1,\!619$	$1,\!562$
10	$3,\!110$	$3,\!820$	$3,\!541$
11	4,703	8,041	$7,\!128$

Tabela 3.2: Tempos médios de permanência em cada estado.

nos respectivos estados, para cada grupo. Por exemplo, o grupo ansiolítico é o que passa mais tempo na posição 1, a última posição do braço aberto, enquanto o grupo controle é o que mais tempo passa na posição 11, última posição do braço fechado. Em comparação também com o grupo ansiolítico, o grupo ansiogênico é o que passa mais tempo na posição 11. Os grupos controle e ansiogênico, passam bastante tempo nas posições 6 e 7, antes de fazerem uma transição, diferentemente do grupo ansiolítico. Comparando novamente com o grupo ansiolítico, os ratos dos grupos controle e ansiogênico levam mais tempo para fazer uma transição, quando estão nas posições 8 e 9.

Somando-se a isso tem-se as taxas de saída para o braço aberto,  $q_{6,5}$ , e para o braço fechado,  $q_{6,7}$ , diferenciando ainda mais o comportamento dos três grupos. Neste ponto foi aplicado o teste  $\chi^2$  de independência, assim como havia sido feito no capítulo anterior, onde pode-se encontrar uma breve descrição sobre o teste (seção 2.3), quando observou-se  $q_{6,5} = 0,09$  e  $q_{6,7} = 0,21$ , para o grupo controle(p < 0,01),  $q_{6,5} = 0,20$  e  $q_{6,7} = 0,26$ , para o grupo ansiolítico (sem tendência), e  $q_{6,5} =$ 



Figura 3.5: Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga.

0,06 e  $q_{6,7} = 0,15$ , para o grupo ansiogênico (p < 0.01). Os grupos controle e ansiogênico tem taxas maiores em direção aos braços abertos, enquanto o grupo ansiolítico tem um certo equilíbrio entre as taxas para os braços abertos e fechados. Há portanto, uma tendência dos grupos controle e do ansiogênico irem em direção ao braço fechado, padrão que o grupo ansiolítico não segue.

Completando a análise do Modelo a Tempo contínuo, foram calculadas as distribuições de probabilidade estacionárias,  $\mu$ , para os grupos controle, ansiolítico e ansiogênico, apresentadas na tabela 3.3 e no gráfico da figura 3.5. Lembrando que cada elemento de  $\mu = (\mu_1, \dots, \mu_{11})$ , representa a proporção de tempo que o rato passa em cada estado, depois de um certo número de transições, ou ainda,  $\mu$  representa a chance de se encontrar a cadeia em cada um dos seus estados. A distribuição estacionária  $\mu$  do processo markoviano a tempo contínuo está mais próxima da realidade do que a  $\pi$  calculada para a cadeia de Markov a tempo discreto. Contudo, hipóteses muito fortes foram usadas, como a propriedade de Markov e a homogeneidade das taxas ao longo do tempo, e não se sabe como as mesmas afetam a realidade do que se passa na exploração do LCE pelos ratos.

Estado	Ansiolítico	Controle	Ansiogênico
1	0,0815	$0,\!0109$	0,018
2	$0,\!0843$	$0,\!0169$	0,0238
3	$0,\!0361$	0,0104	$0,\!015$
4	$0,\!0366$	$0,\!0149$	0,016
5	$0,\!0746$	$0,\!0216$	0,0286
6	0,1314	$0,\!0946$	$0,\!1547$
7	0,1061	$0,\!1866$	0,196
8	$0,\!0644$	$0,\!1187$	0,1188
9	$0,\!0584$	$0,\!0981$	0,091
10	0,204	$0,\!2181$	0,1814
11	0,1226	0,2093	0,1568

Tabela 3.3: Distribuição de probabilidades estacionária para cada tipo de droga.

Os valores da distribuição estacionária de probabilidade para o grupo ansiogênico indicam que os ratos desse grupo podem ser encontrados com mais frequência nas posições 7 e 10, ambas do braço fechado. Já os ratos do grupo controle tem mais chance de serem encontrados nas posições 10 e 11, com a posição 7 vindo em seguida. Os dois grupos se diferenciam pela posição central, na qual o grupo ansiogênico apresenta maior probabilidade de ser encontrado do que o grupo controle. Por outro lado, o grupo ansiolítico aparece mais nas posições 6 e 10. Contudo este último grupo se diferencia dos demais por apresentar em relação aos mesmos maior probabilidade dos ratos serem encontrados nas posições 1 e 2, duas últimas posições do braço aberto, região considerada de grande risco pelos ratos.

Até este ponto, as análises realizadas para o modelo contínuo foram feitas sobre os valores calculados para os grupos controle, ansiolítico e ansiogênico, sem considerar as subdivisões destes últimos. Porém, com o interesse de comparar os resultados aqui obtidos com aqueles apresentados no artigo que inspirou este trabalho (TEJADA et al., 2010), que utilizou os grupos CDP, PTZ30 e controle, decidiu-se



Figura 3.6: Distribuição de probabilidades estacionária do modelo discreto ( $\pi$ ) calculadas para os grupos CDP (ansiolítico), controle e PTZ30 (ansiogênico).

analisar as mudanças nas distribuições de probabilidade apresentadas naquele trabalho,  $\pi$ , e as que foram calculadas para o tempo contínuo. Dado que não se dispunha de todos os registros utilizados por Tejada et al. (2010), os valores calculados por ele foram recalculados com os registros de que se dispunha, sendo seus resultados mostrados na figura 3.6.

Uma vez verificada a semelhança com a Figura 6 do citado artigo, foram calculadas as distribuições de probabilidade estacionárias ( $\mu$ ) a partir das matrizes de taxas destes grupos. Uma vez que tais cálculos foram feitos apenas com o intuito de realizar esta comparação, considerou-se desnecessário reproduzir aqui as matrizes obtidas. Os valores encontrados são apresentados na figura 3.7, onde podem ser observadas grandes diferenças daqueles que desconsideram o tempo. Com o intuito de observar melhor estas diferenças, os valores de  $\pi$  e  $\mu$  também são apresentados na tabela 3.4.

Comparando os valores de  $\pi$  (discreto) e  $\mu$  (contínuo) para o grupo controle, observa-se um pequeno aumento na probabilidade do rato ser encontrado no ex-

	CDP		Con	trole	PTZ30		
Estado	$\mu$	$\pi$	$\mu$	$\pi$	$\mu$	π	
1	$0,\!146117$	0,04018	$0,\!011014$	0,007677	0	0	
2	$0,\!063657$	0,08787	$0,\!016921$	0,023728	$0,\!004437$	$0,\!00578$	
3	$0,\!043960$	0,09536	$0,\!010398$	0,034545	0,003269	$0,\!01156$	
4	0,040328	0,09405	$0,\!014912$	0,040826	0,006180	$0,\!01541$	
5	$0,\!066925$	0,09079	$0,\!021637$	0,048787	0,019443	$0,\!03275$	
6	$0,\!126393$	0,09729	$0,\!094644$	0,087166	0,119546	0,09439	
7	$0,\!079745$	0,10977	$0,\!187315$	0,143747	0,170480	$0,\!16155$	
8	$0,\!061926$	0,11534	$0,\!118704$	0,173312	0,141670	$0,\!19697$	
9	$0,\!054603$	0,11818	$0,\!098323$	0,186022	$0,\!073595$	$0,\!20711$	
10	$0,\!161806$	0,10546	$0,\!218199$	0,174969	0,272168	$0,\!18745$	
11	$0,\!154541$	0,04571	$0,\!207933$	0,079222	0,189212	0,08703	

Tabela 3.4: Distribuição de probabilidades estacionária dos modelos contínuo ( $\mu$ ) e discreto ( $\pi$ ) calculadas para os grupos CDP (ansiolítico), controle e PTZ30 (ansio-gênico).



Figura 3.7: Distribuição de probabilidades estacionária do modelo contínuo ( $\mu$ ) calculadas para os grupos CDP (ansiolítico), controle e PTZ30 (ansiogênico).

tremo do braço aberto (estado 1), embora o valor para essa probabilidade continue pequeno. Para as demais posições do braço aberto esse valor diminui, sendo que a magnitude desta diminuição se torna maior quanto mais o estado se aproxima do centro. Tais diferenças entre os modelos discreto e contínuo, são pequenas quando olhadas isoladamente, porém juntas representam uma queda de 8% na probabilidade do rato ser encontrado no braço aberto. Para a posição central, novamente se observa um pequeno aumento. O braço fechado foi a região onde as maiores diferenças foram observadas, tanto sua posição mais próxima do centro (estado 7), quanto a penúltima (estado 10) aumentaram em 4%. As posições entre estas (estados 8 e 9) tiveram suas probabilidades diminuídas em cerca 5% e 9% em relação aos valores encontrados através do modelo discreto. O extremo do braço fechado mostrou a maior diferença entre as probabilidades, aumentando em 13% e mostrando que os ratos desse grupo preferem muito mais esta posição do que o que seria imaginado ao desconsiderar o tempo.

Fazendo esta mesma comparação para os valores calculados para o grupo ansiolítico CDP, observa-se um grande aumento na probabilidade do rato ser encontrado em um dos extremos do labirinto (cerca de 10% a mais em cada extremo). O estado 10 também apresentou um aumento de probabilidade (6%), bem como a posição central (3%). Os estados intermediários de ambos os braços tiveram suas probabilidades diminuídas em relação àquelas calculadas ao desconsiderar o tempo.

Analisando-se da mesma forma o grupo ansiogênico mais representativo (PTZ30), observa-se uma diminuição de 3% de probabilidade do rato ser encontrado no braço aberto. A probabilidade dele ser encontrado no centro se mostrou também cerca de 3% maior do que havia sido encontrado ao desconsiderar o tempo. O inicio do braço fechado (estado 7) se mostrou ligeiramente mais provável do que o modelo discreto apontava. As duas posições seguintes tiveram suas probabilidades diminuídas 5% e 13% em relação às calculadas pelo modelo discreto. As outras duas, assim como nos outros grupos, aumentaram.

Estes três grupos mostraram que as probabilidades reais,  $\mu$  (figura 3.7), do rato ser encontrado em cada posição estão subestimadas para as duas posições mais próximas do extremo do braço fechado (estados 10 e 11) pelos valores de  $\pi$  (figura 3.6). Enquanto que para as posições intermediárias de cada braço elas estão superestimadas pelo modelo discreto.

# Capítulo 4

## ANÁLISE ETOLÓGICA: UMA MODELAGEM A TEMPO DISCRETO

Nos dois capítulos anteriores foram apresentados modelos para a sequência de posições que os ratos ocupam no LCE, ao longo do tempo. Contudo, os registros utilizados neste trabalho também contém uma descrição de outros comportamentos assumidos pelos animais durante a sessão de 5 minutos. Neste capítulo será apresentado um modelo markoviano a tempo discreto usando como estados os comportamentos mais executados pelos ratos durante o período do experimento. Todo o embasamento teórico necessário ao entendimento deste capítulo já foi apresentado no capítulo 2 (seção 2.1). Na seção 4.1 serão descritos os comportamentos considerados neste modelo (subseção 4.1.2), os dados utilizados para a modelagem (subseção 4.1.1) e as características do modelo (subseção 4.1.3). Na seção 4.2 serão apresentados e discutidos os resultados encontrados, separados por aqueles resultados observados diretamente nas matrizes (subseção 4.2.1), aqueles referentes à análise de tempos médios de primeira visita (subseção 4.2.2) e aqueles referentes à análise das distribuições de probabilidade estacionárias (subseção 4.2.3).

#### 4.1 Materiais e Métodos

#### 4.1.1 Sujeitos

Inicialmente pretendia-se utilizar os mesmos dados dos ratos descritos no capítulo 2, mais especificamente na tabela 2.1. Porém nem todos os ratos continham

Droga	Dose $(mg/Kg)$	Quantidade			
Contro	le	25			
Grupo	38				
CDP	5	21			
MDZ	1	17			
Grupo	Grupo Ansiogênico				
SCZ	20	11			
ΡTΖ	30	9			

Tabela 4.1: Quantidade de ratos e dosagem de drogas em cada grupo experimental utilizados neste estudo etológico.

os registros dos comportamentos que pretendia-se estudar nesta parte do trabalho (que serão descritos na seção 4.1.2). A saber, tais comportamentos não haviam sido registrados nos grupos tratados com 10mg/Kg e 20mg/Kg de pentilenotetrazol (PTZ10 e PTZ20). Por isso, os grupos de ratos utilizados nesta parte do trabalho são apresentados na tabela 4.1.

#### 4.1.2 Comportamentos

A amostra utilizada neste capítulo é formada por uma sequência de comportamentos executados consecutivamente pelos ratos ao longo da sessão, intercalados pelo andar dos mesmos no labirinto. Mais precisamente, os arquivos de dados utilizados são formados por uma lista dos comportamentos executados pelo rato durante a sessão de 5 minutos, cada comportamento associado em uma tabela com algumas informações adicionais sobre ele. Os comportamentos mais registrados e serão utilizados nesta modelagem são os seguintes:

grooming - auto-limpeza;

*freezing* - diante de um estímulo aversivo o rato fica parado com as suas orelhas levantadas e o pelo arrepiado;

- *rearing* exploração vertical: o rato se levanta nas suas patas traseiras, apoiado ou não nas paredes do labirinto;
- *dipping* colocar a cabeça para fora da borda do labirinto e para baixo;
- stretching ato de esticar: o rato deixa suas patas traseiras fixas e estica o resto do seu corpo em direção ao local que quer explorar;

#### 4.1.3 Modelo

Como já foi dito na seção 4.1.1, esses comportamentos são intercalados pelo caminhar dos ratos nos braços do labirinto. Depois de testar alguns modelos que incluíssem esses comportamentos num modelo mais geral, foi decidido construir um modelo Markoviano envolvendo apenas os 5 comportamentos descritos na seção 4.1.2, sem o caminhar dos ratos entre os mesmos (BOSCO et al., 2013). Os 5 comportamentos foram considerados como os estados de uma cadeia de Markov a tempo discreto. Dessa forma, foram consideradas apenas as transições entre um comportamento e outro, podendo haver transição entre um comportamento e ele mesmo. A figura 4.1 mostra os comportamentos e suas conexões. Foram desconsiderados os intervalos de tempo que os ratos permaneceram executando os diversos comportamentos, e o tempo gasto entre um comportamento e seu subsequente. Considerou-se também a hipótese das probabilidades de transição entre um estado e outro, não se alterar ao longo da sessão, ou seja, foi usada uma cadeia homogênea no tempo. Diferentemente dos modelos anteriores, nesta cadeia todos os estados se comunicam entre si. As probabilidades de transição,  $p_{i,j}$ , também foram estimadas pelo princípio da máxima verossimilhança.

### 4.2 Resultados

#### 4.2.1 Matrizes Estocásticas

Assim como foi feito nos modelos anteriores, os registros foram processados por um programa implementado na linguagem Java (GOSLING et al., 2005), que extraiu



Figura 4.1: Modelo etológico de cadeia de Markov (figura baseada em Casarrubea et al. (2013)).

de cada arquivo de dados, as sequências de comportamentos assumidos por todos os grupos de ratos utilizados. Em seguida, este mesmo software utilizou a sequência extraída para calcular o total de transições entre cada par de estados, realizadas por todos os ratos de cada grupo. E, com esses totais pode-se calcular as probabilidades  $p_{i,j}$ , gerando as matrizes de transições de cada grupo, apresentadas nas figuras 4.2 - 4.6

Conforme pode-se observar nas matrizes, os arquivos dos ratos do grupo ansiogênico SCZ (figura 4.5) não possuíam registros do estado *freezing*. Além disso, para

	rearing	stretching	dipping	grooming	free zing
rearing	(0,688)	0,146	0,036	0, 116	0,014
stretching	0,100	0,562	0,252	0,078	0,008
dipping	0,084	0,232	0,658	0,024	0,002
grooming	0,147	0,096	0,029	0,718	0,010
freezing	0,195	0,146	0,001	0,146	0,512

Figura 4.2: Matriz de probabilidades de transições etológica calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiolítica CDP.

	rearing	stretching	dipping	grooming	freezing
rearing	0,4686	_	0,298	0,234	- )
stretching	—	—	—	—	-
dipping	0,150	—	0,832	0,019	-
grooming	0,667	—	0,200	0,133	-
freezing	- /	—	—	—	_ /

Figura 4.3: Matriz de probabilidades de transições etológica calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiolítica MDZ.

	rearing	stretching	dipping	grooming	free zing
rearing	0,698	0,093	0,036	0,171	0,002
stretching	0, 189	0,566	0,160	0,083	0,002
dipping	0,158	0,236	0,579	0,027	0,000
grooming	0,188	0,052	0,016	0,743	0,001
freezing	0,111	0,111	0,000	0,334	0,445 /

Figura 4.4: Matriz de probabilidades de transições etológica calculada para o grupo controle.

	rearing	stretching	dipping	grooming	free zing
rearing	0,592	0,089	0,136	0,183	- )
stretching	0,333	0, 139	0,500	0,028	—
dipping	0,302	0,103	0,586	0,009	—
grooming	0,512	0,093	0, 116	0,279	_
freezing	\  _	_	_	_	_ /

Figura 4.5: Matriz de probabilidades de transições etológica calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiogênica SCZ.

	rearing	stretching	dipping	grooming	free zing
rearing	0,690	0,164	0,011	0, 127	0,008
stretching	0,109	0,709	0,070	0, 107	0,005
dipping	0,020	0,455	0,515	0,010	0,000
grooming	0,058	0,081	0,003	0,857	0,001
freezing	0,000	0,188	0,062	0,250	0,500

Figura 4.6: Matriz de probabilidades de transições etológica calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiogênica PTZ.

	rearing	stretching	dipping	grooming	freezing
rearing	0	$7,\!16$	12,18	12,19	$115,\!95$
stretching	$9,\!69$	0	7,60	$14,\!30$	118,71
dipping	10, 10	$5,\!29$	0	$15,\!67$	$120,\!17$
grooming	8,13	$^{8,09}$	$12,\!95$	0	$116,\!54$
free zing	7,39	$7,\!34$	$13,\!08$	11,21	0

Tabela 4.2: Tempos médios de primeira visita, ao estado dado pela coluna partindo do estado dado pela linha, para o grupo de ratos submetido à droga ansiolítica CDP.

o grupo tratado com a droga ansiolítica MDZ (figura 4.3), tanto este estado como o estado *stretching* não foram registrados. Por isso estes dois grupos foram desconsiderados. Desta forma o grupo ansiolítico ficou representado pelos ratos tratados com a droga CDP (figura 4.2) e o grupo ansiogênico pelos ratos tratados com 30mg da droga PTZ para cada quilo do animal (figura 4.6). O grupo controle continua sendo representado pela matriz da figura 4.4. Estas matrizes foram utilizadas pelo programa para obter dois conjuntos de informações sobre as cadeias: os tempos médios de primeiras visitas a cada um dos estados, partindo dos demais estados, e as distribuições estacionárias de probabilidades.

#### 4.2.2 Tempos Médios de Primeira Visita

Foram calculados os tempos médios de primeira visita a cada estado, usando como estado inicial cada um dos outros estados. Isto foi feito através da resolução de um sistema de equações no mesmo formato explicado e usado no capítulo 2. Para resolver esse sistema foi utilizado o algoritmo Gauss Compacto (FRANCO, 2006) implementado no mesmo programa em Java. Os tempos encontrados são apresentados nas tabelas 4.2 para o grupo ansiolítico, 4.3 para o grupo ansiogênico e 4.4 para o grupo controle. Nessas tabelas os estados iniciais estão nas linhas, e os estados a serem atingidos estão nas colunas.

Analisando-se as tabelas 4.2, 4.3 e 4.4, pode-se observar que quando o estado dipping é considerado como o estado a ser atingido, os resultados mostram um

	rearing	stretching	dipping	grooming	freezing
rearing	0	$7,\!71$	41,77	8,89	255,23
stretching	$12,\!31$	0	$36,\!24$	$^{9,63}$	$257,\!11$
dipping	$13,\!9$	$2,\!60$	0	11,46	$259,\!12$
grooming	$14,\!33$	$10,\!26$	44,83	0	$260,\!85$
free zing	15,52	$7,\!46$	$38,\!00$	$7,\!04$	0

Tabela 4.3: Tempos médios de primeira visita, ao estado dado pela coluna partindo do estado dado pela linha, para o grupo de ratos submetido à droga ansiogênica PTZ 30mg/kg.

	rearing	stretching	dipping	grooming	free zing
rearing	0	$11,\!60$	21,38	7,53	$733,\!69$
stretching	5,50	0	$16,\!09$	$9,\!49$	$734,\!99$
dipping	$5,\!80$	$7,\!55$	0	10,53	$736,\!91$
grooming	5,38	$12,\!88$	22,89	0	$735,\!48$
free zing	6,13	$11,\!85$	$23,\!02$	5,20	0

Tabela 4.4: Tempos médios de primeira visita, ao estado dado pela coluna partindo do estado dado pela linha, para o grupo controle.

		Estado a ser visitado		
Início	Grupos	stretching	dipping	grooming
	Ansiolítico	7,16	12,18	$12,\!19$
rearing	Controle	$11,\!6$	$21,\!38$	$7,\!53$
	Ansiogênico	7,71	41,77	8,89
	Ansiolítico	0	$^{7,6}$	$14,\!3$
stretching	Controle	0	$16,\!09$	$9,\!49$
	Ansiogênico	0	$36,\!24$	$9,\!63$
	Ansiolítico	5,29	0	$15,\!67$
dipping	Controle	7,55	0	$10,\!53$
	Ansiogênico	$^{2,6}$	0	$11,\!46$
	Ansiolítico	8,09	$12,\!95$	0
grooming	Controle	12,88	22,89	0
	Ansiogênico	10,26	44,83	0
	Ansiolítico	$7,\!34$	$13,\!08$	$11,\!21$
free zing	Controle	11,85	$23,\!02$	$^{5,2}$
	Ansiogênico	7,46	38	$7,\!01$

Tabela 4.5: Tempos médios de primeira visita para todos os grupos a partir de cada estado inicial para os estados *stretching*, *dipping* e *grooming*.

padrão no comportamento dos ratos. Isso pode ser melhor visualizado na coluna dipping da tabela 4.5. Para cada estado inicial, ocorre um ordenamento crescente do número médio de transições até a primeira visita ao estado dipping. Como o comportamento desse estado está diretamente associado a um comportamento mais exploratório, esse ordenamento é bastante coerente. Quanto menos ansioso está o rato, maiores são as chances de explorar os braços abertos e colocar a cabeça na borda do labirinto. Isso explica por que o número médio de transições até esse estado aumenta quando se translada do grupo ansiolítico para o grupo ansiogênico, sendo natural que o grupo controle esteja entre os dois. O número médio de transições para atingir o estado grooming (auto-limpeza), comportamento assumido pelo rato quando já explorou bastante o ambiente, foi maior no grupo ansiolítico, seguido pelo grupo ansiogênico, e o menor valor ocorreu no grupo controle. Este padrão foi observado para qualquer outro comportamento considerado como estado inicial. Os resultados podem ser melhor visualizados na coluna grooming da tabela 4.5. Esses resultados são coerentes pois um rato submetido a uma substância ansiolítica tende a explorar o labirinto por mais tempo, enquanto que aquele submetido a uma substância ansiogênica tende a explorar menos o ambiente.

Outro resultado interessante a ser notado na tabela 4.5 está na comparação entre as colunas *dipping* e *stretching*. O comportamento *stretching* (esticar o corpo para explorar o local), geralmente é efetuado pelo rato ao retornar ao centro do labirinto após ter explorado um braço fechado, antes de começar a explorar um braço aberto. Uma vez que o estado *dipping* só pode ocorrer no interior do braço aberto, é coerente esperar que o tempo médio de primeira visita ao estado *stretching* seja menor do que aquele para o estado *dipping*. Esta relação pode ser observada em todos os grupos e para todos os estados iniciais.

#### 4.2.3 Distribuição de Probabilidade Estacionária

A mesma implementação do algoritmo para resolução de sistemas de equações lineares citada na seção anterior foi utilizada para resolver outro conjunto de equações que fornece a distribuição estacionária de probabilidades. Esta distribuição de probabilidades, conforme descrito no capítulo 2, informa sobre a proporção de tempo que o rato executa determinado comportamento para um número suficientemente grande de transições, que como foi verificado, é atingido dentro da sessão de 5 minutos. Os valores obtidos são apresentados na tabela 4.6.

O primeiro estado que requer atenção nessa tabela é o *freezing*, que apresenta valores próximos de 0 para os grupos ansiolítico (2%) e controle (0, 34%), e um valor consideravelmente maior para o grupo de ratos tratados com a droga ansiogênica (21, 6%). Este resultado mostra a importância do comportamento *freezing* para

	Ansiolítico	Controle	Ansiogênico
dipping	24,10%	$7,\!88\%$	$9{,}18\%$
grooming	$21{,}50\%$	36,95%	$11,\!15\%$
rearing	$26,\!30\%$	$37,\!91\%$	$17{,}09\%$
free zing	$2{,}00\%$	$0,\!34\%$	$21,\!60\%$
stretching	26,10%	$16,\!92\%$	$40,\!98\%$

Tabela 4.6: Probabilidade estacionária.

identificar ratos que exibam comportamento de tipo mais ansioso, e é condizente com o que seria esperado pela teoria sobre seu comportamento (HOGG, 1996).

Pode-se notar também que para o grupo de ratos tratado com a droga ansiolítica, todos os estados, exceto o *freezing*, têm probabilidades aproximadamente iguais de ocorrerem. Ou seja, os ratos dos quais se espera um comportamento de tipo menos ansioso não apresentam preferência por nenhum dos comportamentos estudados.

Analisando-se os grupos controle e ansiogênico, nota-se que ambos apresentam probabilidades relativamente baixas para o estado *dipping*, o que é condizente com o que foi observado na seção anterior. Dos estados restantes, nota-se que enquanto para o grupo ansiogênico os estados com maior probabilidade são *freezing* e *stretching*, para o grupo controle os outros dois estados, grooming e rearing, são mais prováveis.

Embora no grupo ansiogênico o estado *freezing* tenha uma probabilidade alta, o estado *stretching* é aquele com maior probabilidade. Este resultado poderia ser explicado por uma maior relação do estado *freezing* com o medo ao invés da ansiedade (RODGERS; DALVI, 1997; SILVA; BRANDÃO, 2000), enquanto o comportamento de se esticar (*stretching*) estaria fortemente relacionado ao processo de tomada de decisão, e sua alta probabilidade indicaria que o rato gastaria mais tempo no processo de tomada de decisão. Ou seja, a alta probabilidade do estado *stretching* mostra maior hesitação do rato e, portanto, maior ansiedade.

Já as probabilidades estacionárias observadas no grupo controle mostram que o rato não apresenta medo, devido à baixa probabilidade do estado freezing, embora

evite o comportamento *dipping* considerado o mais perigoso. Além disso o rato não hesita demasiadamente em suas decisões, o que é apontado pelo fato de a terceira menor probabilidade ser a do estado *stretching*. Os outros dois estados (*grooming* e *rearing*) que apresentam probabilidades altas e aproximadamente iguais, geralmente são executados no interior de um braço fechado. Portanto, a distribuição de probabilidades estacionária para esse grupo, parece representar um nível de cautela moderado assumido pelo rato.

Neste modelo, ao serem desconsiderados o tempo de permanência nos respectivos estados e também o tempo gasto no comportamento exploratório, representado também pelo caminhar, as distribuições de probabilidade estacionárias são apenas uma aproximação do que ocorre na realidade. Mesmo a hipótese Markoviana é bastante forte, pois o andar do rato pelo labirinto pode influenciar mais a execução de um comportamento, do que o comportamento assumido segundos ou minutos antes. Contudo, esta modelagem, com todos esses pontos críticos, consegue separar os grupos ansiogênico, ansiolítico e controle. Essa é a parte mais importante do trabalho apresentado neste capítulo: colocar hipóteses fortes como a Markoviana e a homogeneidade no tempo, reduzir ao mínimo o espaço de estados, e ainda assim conseguir diferenciar os três grupos de ratos estudados.

# Capítulo 5

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A complexidade do comportamento de roedores no LCE tem exigido o desenvolvimento de diferentes abordagens, usando uma variedade de ferramentas matemáticas, estatísticas e computacionais (ARANTES et al., 2013a). Algumas dessas tentativas tem oferecido informações sobre o aspecto espacial e temporal do comportamento do roedor relacionado à ansiedade. Outras tem fornecido hipóteses sobre variáveis que controlam o comportamento animal, oferecendo em alguns casos intuições que requerem novos experimentos.

Os quatro modelos apresentados na introdução deste trabalho (seção 1.1) podem ser considerados no máximo parcialmente bem sucedidos nas suas tentativas de modelar o comportamento do rato no LCE. Eles produzem resultados que estão qualitativamente, e em alguns casos quantitativamente, de acordo com experimentos com ratos reais, mas há muitas deficiências que não permitem considerá-los completamente bem sucedidos. Este sucesso parcial obtido pelos modelos indica que há muitas características a serem melhoradas e novos desenvolvimentos a serem feitos.

O modelo de Salum, Morato e Silva (2000) é um dos mais próximo da teoria de comportamento de ratos no LCE. Ele assume que ratos tem uma motivação para explorar novos ambientes, que diminui com o número de vezes que determinada exploração é feita; e uma aversão de se mover para certos lugares do LCE, que inicialmente é a mesma para todos os lugares, mas aumenta ou diminui respectivamente para lugares mais ou menos aversivos, com o número de vezes que esses lugares são visitados. Ele também assume que os deslocamentos do rato tem um componente aleatório com viés forte para a direção para a qual sua cabeça está virada. A competição entre a motivação e a aversão variando no tempo juntos com o componente aleatório deveriam ser os principais responsáveis pelo comportamento do rato. A principal deficiência desse modelo é seu grande número de parâmetros, que foram encontrados por tentativa e erro. Apesar do modelo produzir uma boa aproximação dos resultados experimentais para ratos em condições normais, o grande número de parâmetros reduz sua generalidade e limita sua aplicabilidade.

O modelo de Costa et al. (2012) assume uma estrutura conexionista responsável pelo comportamento do animal. A recorrência da estrutura e a não linearidade do processamento, torna o modelo difícil de ser interpretado em termos comportamentais. A principal deficiência desse modelo é a busca por um conjunto ideal de pesos baseado em uma função de ajuste global. Além disso, a função de ajuste não é capaz de produzir uma solução em acordo quantitativo com algumas medidas experimentais. Inspirado pelo modelo anterior (SALUM; MORATO; SILVA, 2000), sua função de ajuste é baseada na competição de dois termos, um de motivação exploratória e outro de aversão exploratória. Porém, as punições recebidas pela exploração de um braço são independentes da posição dentro dele, isto pode ser a causa da probabilidade de estar no início do braço fechado ser maior do que de estar no seu final, o que não ocorre com ratos reais.

Este tipo de modelo, baseados em redes neurais artificiais, tende a ter muitos parâmetros introduzidos para capturar diferenças de comportamento observadas em diferentes partes do labirinto. Isso reduz a generalidade dos modelos. Uma estratégia possível para tornar esses modelos mais gerais poderia ser relacionar sua construção hipotética ao substrato neural subjacente responsável pelo comportamento exploratório movido pela ansiedade. Poderia-se ampliar o interesse desses modelos fazendo-os aplicáveis não somente ao teste LCE mas também a outros testes de ansiedade. Esta melhoria, porém, não foi realizada por este trabalho, que se focou na abordagem estocástica e probabilística dos modelos de LCE. Portanto, até onde se tinha conhecimento ao fechar este trabalho, esta ainda é uma melhoria a ser executada nesta classe de modelos.

O modelo de Giddings (2002) não assume nenhuma hipótese a respeito do que

pode causar o comportamento do rato no LCE. Ele é baseado simplesmente em regras probabilísticas derivadas da observação de uma amostra de ratos submetidos ao LCE sob condições normais. Uma vez que as regras são baseadas nas posições presente e passada ocupadas pelo rato, o modelo incorpora um tipo de memória. Porém, as probabilidades usadas não variam com o tempo, portanto o modelo não pode capturar as variações na atividade exploratória do rato ao longo do teste.

O modelo de Tejada et al. (2010) também é baseado em probabilidades obtidas empiricamente, porém ele é mais simples que o modelo anterior (GIDDINGS, 2002) porque assume um mecanismo sem memória por trás da decisão de movimento do rato. Já que as probabilidades são constantes, esse modelo também não é capaz de abarcar aspectos temporais do comportamento do rato. Por outro lado, este é o único modelo que foi aplicado ao rato sob condições farmacológicas diferentes do caso controle. Comparando entre estas condições, o melhor ajuste foi obtido por ratos sob efeito de drogas ansiolíticas, o que indica ser essa situação mais próxima de um processo exploratório sem memória.

Por que um modelo sem memória foi capaz de replicar, mesmo que qualitativamente, a parte espacial do comportamento exploratório do rato no LCE? A resposta pode estar na importância do local onde o rato se encontra para o comportamento relacionado à ansiedade. Independente do histórico da exploração, o local em que o animal está possui uma aversividade intrínseca e isso é um componente importante para a decisão do animal de para onde ir no próximo deslocamento.

A utilidade dos modelos probabilísticos poderia aumentar se eles fossem estendidos para considerar drogas caracterizadas por curvas dose-resposta não-lineares, tais como canabinoides, que produzem uma curva em formato de sino, ou que apresentem efeitos assintóticos (MOREIRA et al., 2009). As probabilidades de transição para animais sob efeito dessas drogas podem variar de forma não monotônica com a dose da droga e ter um modelo que reproduz essa variação seria de grande ajuda no estudo de efeitos relacionados à ansiedade causada por estas drogas.

Tal melhoria, porém, necessitaria do esforço conjunto de grupos experimentais e computacionais. Este não foi o caso deste trabalho que se focou apenas em obter melhorias na parte matemática e computacional dos modelos. As melhorias alcançadas por este trabalho poderiam ser incorporadas a trabalhos futuros que foquem no estudo deste tipo de drogas. Até onde se tinha conhecimento ao terminar este trabalho, esta questão continuava aberta.

Outra melhoria a ser feita sobre os modelos probabilísticos seria usar modelos que levem em consideração mais informações do passado, como modelos de cadeia de ordem superior. A principal dificuldade com esse tipo de abordagem é determinar quantos estados passados influenciam a escolha do novo estado, porém existem testes estatísticos para determinar isso (AKAIKE, 1974; SCHWARZ, 1978; ZHAO; DO-REA; GONÇALVES, 2001). Tais estudos foram realizados, porém alguns problemas relativos ao tamanho das amostras impossibilitaram chegar a resultados conclusivos, por isso foram deixados de fora desta tese. Soube-se ainda de outro grupo realizando tal estudo (COSTA et al., 2014), porém, até o término desta tese tal estudo não havia sido concluído.

Uma outra crítica frequente ao modelo de Tejada et al. (2010) é o fato de ele não propor um índice conciso, cujos valores diferenciem os grupos ansiogênico, ansiolítico e controle. A obtenção de tal índice, constituiu a principal motivação para o inicio deste trabalho. Para a sua obtenção foram propostas várias abordagens, que tiveram como base as matrizes estocásticas, que diferenciaram de maneira geral os grupos controle, ansiolítico e ansiogênico.

A primeira verificação foi feita diretamente sobre as matrizes obtidas de cada grupo de ratos. Nesta fase foi realizado o teste  $\chi^2$  de independência sobre os dados de cada linha da matriz. Verificou-se então que, o rato do grupo ansiogênico ou controle estando no centro tem a preferência em ir para um braço fechado, o que não ocorre para ratos ansiolíticos. Dentre os dois grupos ansiolíticos, foi verificado ainda que uma vez na posição vizinha ao extremo do braço aberto (estado 2), os ratos tratados com MDZ têm preferência significativa por se afastar do extremo, indo para o estado 3, contra a opção de ir para este extremo (estado 1), o que não foi detectado nos ratos tratados com CDP, mostrando que esta ultima gerava um comportamento exploratório mais próximo do passeio aleatório simples simétrico.

A abordagem seguinte, que gerou a uma primeira proposta de índice de ansiedade, partiu das distribuições estacionárias de probabilidade. Estas não foram capazes de ordenar os três tipos de tratamento com o controle no meio, porém ao se analisar seus gráficos, notou-se que as suas inclinações próximas ao centro aparentavam ter a ordem desejada. Após algumas tentativas, concluiu-se que a melhor fórmula matemática para o índice que traduzisse essa observação seria  $\pi_6 - \pi_5$ . Este índice mostrou uma boa ordenação dos grupos estudados, sendo os menores valores associados aos comportamentos de tipo menos ansioso. Porém este índice não apresentou diferenças estatisticamente significativas em os grupos estudados.

A próxima verificação foi feita sobre os tempos médios de primeira visita calculados a partir destas matrizes. Verificou-se que para todos os grupos os tempos médios para uma posição a determinada distância do centro do LCE em um braço aberto, é sempre maior que o tempo médio para a posição do braço fechado que se encontra a essa mesma distância. Essa diferença parece diminuir quanto menos tipo ansioso for o comportamento esperado para o grupo para o qual ela é calculada. Embora, para esse critério, o grupo ansiogênico tenha ficado entre o ansiolítico e o controle. Notou-se ainda um certo grau de simetria em relação ao centro em todos os gráficos destes tempos médios.

Esta simetria inspirou a próxima verificação, que foi a primeira proposta de índice deste trabalho:  $I_d = \frac{t^{(d+6)}}{t^{(6-d)}}$ , onde d = 1, 2, 3, 4, 5 são distâncias de cada posição ao centro e  $t_i$  é o tempo médio de primeira visita ao estado *i* partindo do centro (estado 6). Como imaginado, estes valores permanecem aproximadamente iguais ao variar *d*, portanto o índice se torna  $I_1 = \frac{t^{(7)}}{t^{(5)}}$ , escolhido por ser possível calcular para a maior quantidade de ratos. Este índice indica valores maiores quanto mais tipo ansioso for o comportamento esperado para o grupo, separando bem os dois tipos de ansiolítico (novamente CDP ficando com a posição de melhor ansiolítico); porém ao comparar entre grupos ansiogênicos, o índice não apresentou sucesso em separar os grupos.

Ainda com interesse em possíveis melhorias ao trabalho de Tejada et al. (2010), e dada a recente evidência de estrutura temporal de elementos comportamentais (incluindo as espaço-temporais) durante a exposição do rato ao teste LCE (CA-SARRUBEA et al., 2013), decidiu-se estender o modelo de forma a considerar o tempo. Neste sentido, foi proposto um modelo de processo estocástico markoviano
a tempo contínuo. Esta alteração do modelo discreto para o contínuo, torna o modelo mais próximo da realidade, uma vez que corrige as distribuições estacionárias de probabilidade ( $\pi$  para  $\mu$ ) que antes estariam subestimadas ou superestimadas. Neste sentido, foi verificado que estas probabilidades encontravam-se subestimadas nos extremos de ambos os braços, principalmente do braço fechado e; superestimadas nas posições mais intermediarias de ambos os braços, exceto a penúltima do braço fechado (10), onde foi subestimada. Outra observação interessante sobre as  $\mu$ é que para o grupo ansiolítico, assim como para seus subgrupos, observa-se muita simetria entre os braços aberto e fechado, que não é observado nos demais grupos.

A separação entre os grupos ansiolítico e controle, observada em todas as abordagens descritas, é bastante importante para o desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas. Pois permite a diminuição da quantidade de ratos controle necessários nos testes, uma vez que estes podem ser substituídos por simulações do modelo construído com menos ratos.

Voltando às observações feitas durante a revisão bibliográfica apresentada na introdução desta tese (seção 1.1), quanto à análise fatorial, cabe dizer que a técnica é, até certo ponto, dependente da habilidade de pesquisa de quem a usa. Mesmo que ela produza uma solução que se ajusta bem aos dados, isso não significa que a solução será interpretada de forma significativa (PEDHAZUR; PEDHAZUR, 1991). Isso ocorre, em parte, devido aos pressupostos por trás da construção da tabela que lista variáveis e fatores usados. Estes incluem, por exemplo, a escolha do método de extração e retenção do fator, técnica de rotação do fator e a seleção de valores que devem ser cortados (KIEFFER, 1998).

Apesar destas possíveis fontes de viés, aplicações de análise fatorial ao teste LCE têm revelado consistentemente a importância de medidas diversas das espaçotemporais, para caracterizar o comportamento do roedor no LCE (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997; SETEM et al., 1999; WALL; MESSIER, 2000; SILVA; BRANDÃO, 2000; OHL, 2003; CAROBREZ; BER-TOGLIO, 2005). Uma análise recente do comportamento do rato no teste LCE, baseada em uma técnica diferente, também revelou a importância da inclusão destas medidas para caracterizar o comportamento dos roedores (CASARRUBEA et al., 2013). Com isto em mente, decidiu-se estudar um modelo discreto de cadeias de Markov com estes comportamentos como estados, o que até onde se sabe nunca havia sido feito.

As razões de tal abordagem do problema nunca ter sido realizada são compreensíveis. Afinal, que relação poderia haver entre um comportamento executado pelo rato e seu próximo comportamento, sendo que ele pode ter mudado de lugar entre as duas execuções? Ainda mais sabendo que este modelo desconsidera o tempo que o rato passa executando o comportamento, assim como o tempo entre comportamentos. De fato, tal abordagem utiliza pouquíssima informação e hipóteses bastante fortes. Sendo, portanto, bastante razoável imaginar que tal estudo não apresentaria resultados relevantes.

Porém, ainda assim, ele foi capaz de capturar informações interessantes nos seus resultados, que comprovam, até certo ponto, vários fatos teoricamente esperados. Ao calcular-se a distribuição estacionária de probabilidade, por exemplo, esta revelou uma homogeneidade entre todos os comportamentos no grupo ansiolítico. Revelou ainda que o estado *freezing* seria muito mais provável no grupo ansiogênico do que nos demais. Poderia-se alegar aqui que este comportamento está mais relacionado ao medo do que à ansiedade em si (RODGERS; DALVI, 1997; SILVA; BRANDÃO, 2000), porém, de qualquer forma, este não foi o comportamento mais provável deste grupo, mas sim o *stretching*, cuja probabilidade estacionária também separou bem os grupos. O stretching indica certa hesitação do rato, ele se mantém em um local seguro, mas se estica para ver o que está além daquele local, esta hesitação está relacionada à ansiedade. Se estes dois foram os comportamentos mais prováveis para o grupo ansiogênico, para o controle foram justamente os outros dois (rearing e *grooming*), excluído também o *dipping* que é considerado o mais arriscado de todos por ser o que mais expõe o rato, tal observação foi interpretada como um nível de cautela moderado assumido por esse grupo de ratos.

Observando-se o tempo médio de primeira visita a cada estado, tendo cada um dos outros como ponto de partida, também foi possível observar algumas relações interessantes. Por exemplo, em qualquer um dos grupos e qualquer estado inicial, pode ser observado que o tempo médio para atingir o estado *dipping* é maior do que para atingir o *stretching*. O tempo médio de primeira visita ao estado *dipping*, tendo qualquer outro como ponto de partida, foi menor no grupo ansiolítico, seguido pelo controle e maior no ansiogênico.

Portanto, apesar de todas as deficiências, o modelo conseguiu diferenciar os grupos ansiolíticos, controle e ansiogênicos. Isso mostra algum tipo de memória do rato em relação aos comportamentos, ou seja, apesar de ter mais motivação para explorar o labirinto caminhando sobre ele, os outros comportamentos estão conectados entre si, e se sucedem de uma maneira, digamos, esperada ou lógica.

Outro ponto importante a ser ressaltado sobre este trabalho, é que todos os estudos aqui apresentados assumem que o rato está sendo exposto ao LCE pela primeira vez. Esta informação é importante porque as correlações encontradas nos estudos de análise fatorial de ratos no LCE, mostram que seu comportamento pode mudar na repetição do teste com o mesmo animal. Por exemplo, quando o animal é re-exposto ao teste LCE as variáveis relacionadas com a ansiedade apresentam correlação forte também com o segundo fator (FILE et al., 1993; HOLMES; ROD-GERS, 1998; WALL; MESSIER, 2000). Essa mudança pode ser relacionada ao nível mais intenso de ansiedade observado no segundo teste (FILE et al., 1993; HOLMES; RODGERS, 1998; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDO, 2008; WALL; MESSIER, 2000). Dada essa evidencia, também é importante que futuros esforços de modelamento considerem a possibilidade de mudança no comportamento do animal durante re-teste. O re-teste não foi explorado neste trabalho porque todos os registros aqui utilizados vieram de animais expostos pela primeira vez ao LCE, o que geralmente é usado para os testes de ansiedade.

Além das contribuições referentes às novas medidas capazes de diferenciar certos tratamentos farmacológicos, a tese mostra que a modelagem baseada nos conceitos e resultados de inferência estatística em processos estocásticos (GUTTORP, 1995), pode mostrar aspectos do comportamento nesse labirinto, que poderiam não ser percebidas ao se analisar o dado bruto (movimentação do rato). Além disso, os vários modelos propostos poderiam ser utilizados como material didático para auxiliar no ensino a respeito do comportamento esperado do rato no labirinto, sem que seja necessário o uso de animais reais que são obrigatoriamente sacrificados após um ou mais experimentos.

Finalmente, é importante ressaltar que todos os cálculos feitos na construção de todos estes modelos estão automatizados, uma vez que este trabalho gerou um programa escrito em Java (GOSLING et al., 2005) que pode ser executado para repetir esta análise com outros grupos de ratos, bastando para isso que se obtenham os registros do seu movimento no formato determinado pelo programa. Contudo, em alguns casos, ainda é possível criar uma extensão deste programa para capacitá-lo a processar dados em outros formatos. Outras extensões possíveis poderiam permitir que este programa fosse aplicado a outros tipos de labirinto.

Como perspectivas para futuros trabalhos pode ser citada a criação de um modelo mais próximo da realidade, que incorpore o "caminhar" no labirinto juntamente com os diversos comportamentos que se repetem no mesmo, considerando também o tempo. Além disto, todas as questões que foram citadas ao longo desta discussão como ainda abertas, que ficaria repetitivo listá-las novamente neste ponto, poderiam ser agora estudas. Incluindo entre estas, as adaptações que tornariam o programa computacional implementado, mais genérico e de fácil utilização por qualquer grupo de pesquisa.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance p in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plusmaze test. *Physiology & Behavior*, Elsevier, v. 60, n. 4, p. 1183–1186, 1996.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Autom* Contr. v. 19, p. 716–723, 1974.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K.; BRANDO, M. Activity of the medial prefrontal cortexand amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *JNeurosci Methods*, v. 169, p. 109–18, 2008.

ARABO, A. et al. Temporal analysis of free exploration of an elevated plus-maze in mice. Journal of Experimental Psychology: Animal Learning and Cognition, v. 40, n. 4, p. 457–466, 2014.

ARANTES, R. et al. A continuous time markov chain study of rat behavior in the elevated plus-maze. In: *IBRO 2015 - 9th World Congress of the International Brain Research Organization*. [S.l.: s.n.], 2015. v. 1, p. 1285–1285.

ARANTES, R. et al. Novo Índice para medir ansiedade no labirinto em cruz elevado.
In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC. [S.l.: s.n.], 2013. p. 91–91.

ARANTES, R. et al. Mathematical methods to model rodent behavior in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 220, n. 2, p. 141 – 148, 2013a. ISSN 0165-0270. Disponível em: <a href="http://www.sciencedirect.com/science/article-/pii/S0165027013001726">http://www.sciencedirect.com/science/article-/pii/S0165027013001726</a>>. ARANTES, R. et al. A novel anxiety index for the rat behavior in the elevated plus-maze. *BMC Neuroscience*, BioMed Central, v. 14, n. 1, p. 1, 2013b.

BERTSEKAS, D. P.; TSITSIKLIS, J. N. Introduction to probability. [S.l.]: Athena Scientific Nashua, NH, 2002.

BOSCO, G. et al. Markovian short-term behavior in the elevated plus-maze. In: *XVI Escola Brasileira de Probabilidade*. [S.l.: s.n.], 2012.

BOSCO, G. G. et al. Um estudo etológico do comportamento exploratório de roedores no labirinto em cruz elevado através de cadeias de markov. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC. [S.l.: s.n.], 2013. p. 92–92.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

CASARRUBEA, M. et al. Temporal structure of the rats behavior in elevated plus maze test. *Behav Brain Res*, v. 237, p. 290–9, 2013.

COSTA, A. et al. A model based on genetic algorithm for inves-tigation of the behavior of rats in the elevated plus-maze. In: YIN, H.; COSTA, J.; BARRETO, G. (Ed.). *Intelligent data engineering and automated learning - IDEAL2012*. Berlin Heidelberg: Springer, 2012, (Lecture Notes in Computer Science, v. 7435). p. 151–158.

COSTA, A. A. et al. Análise estocástica da trajetória do rato no labirinto em cruz elevado. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). [S.l.: s.n.], 2014.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 49, n. 1, p. 171–6, 1994. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.biomedsearch.com/nih-/Ethopharmacological-analysis-rat-behavior-elevated/7816869.html">http://www.biomedsearch.com/nih-/Ethopharmacological-analysis-rat-behavior-elevated/7816869.html</a>>. DIESTEL, R. *Graph Theory.* 3rd. ed. [S.l.]: Springer Verlag, 2006. (Graduate Texts In Mathematics). ISBN 9783540261834.

DOREMUS, T. L.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 83, n. 4, p. 570–7, abr. 2006. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678892">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678892</a>>.

DURRETT, R. *Elementary probability for applications*. 1st. ed. New York: Cambridge University Press, 2009.

ELMAN, J. Finding structure in time. Cognitive Sci, v. 14, p. 179-211, 1990.

FERNANDES, C.; FILE, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 54, n. 1, p. 31–40, maio 1996. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm-.nih.gov/pubmed/8728536">http://www.ncbi.nlm-.nih.gov/pubmed/8728536</a>>.

FILE, S. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J.; HEAL, D.; MARSDEN, C. (Ed.). *Experimental approaches to anxiety and depression*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1992. p. 25–44.

FILE, S. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*, v. 125, p. 151–157, 2001.

FILE, S. et al. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psy-chopharmacology (Berlin)*, v. 111, p. 491–4, 1993.

FRANCO, N. B. Cálculo Numérico. [S.l.]: Pearson Prentice Hall, 2006.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & behavior*, v. 85, n. 3, p. 265–70, jun. 2005. ISSN 0031-9384. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm-.nih.gov/pubmed/15927214">http://www.ncbi.nlm-.nih.gov/pubmed/15927214</a>>.

GIDDINGS, J. Modeling the behavior of rats in an elevated plus-maze. Tese (Doutorado) — Acadia University, 2002. GOSLING, J. et al. *The Java<sup>TM</sup>Language Specification*. Third. [S.l.]: Prentice Hall, 2005.

GRAHAM, J.; ALLOWAY, T.; KRAMES, L. Sniffy, the virtual rat: simulated operant conditioning. *Behav Res Methods Instrum Comput*, v. 26, p. 134–41, 1994.

GRIEBEL, G. et al. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 57, n. 4, p. 817–27, ago. 1997. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259011">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259011</a>>.

GUTTORP, P. Stochastic modeling of scientific data. [S.l.]: Chapman & Hall/CRC, 1995.

HAIR, J. et al. *Multivariate data analysis*. 7th. ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2009.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 327, n. 1, p. 1–5, ago. 1984. ISSN 0028-1298. PMID: 6149466. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed-/6149466">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed-/6149466</a>>.

HERTZ, J.; KROGH, A.; PALMER, R. Introduction to the theory of neural computation. Redwood City, CA: Addison-Wesley, 1991.

HOGG, R.; TANIS, E. *Probability and Statistical Inference*. [S.I.]: Prentice Hall, 2001. (Prentice Hall international editions).

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.

HOLMES, A.; RODGERS, R. Responses of swiss-webster mice to repeated plusmaze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Phar*macol Biochem Behav, v. 60, p. 473–88, 1998. JAKUBOW, J. Review of the book sniffy the virtual rat proversion 2.0. J Exp Anal Behav, v. 87, p. 317–23, 2007.

KEMENY, J.; SNELL, J. Finite Markov chains. NJ: Springer, 1976.

KIEFFER, K. Orthogonal versus oblique factor rotation: a review of the literature regarding the pros and cons. In: Annual meeting of the mid-south educational research association. [S.l.: s.n.], 1998.

KINOUCHI, O. et al. The non-equilibrium nature of culinary evolution. *New J Phys*, v. 10, p. 073020, 2008.

LAWLER, G. F. Introduction to stochastic processes. [S.I.]: CRC Press, 2006.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychophar-macology (Berlin)*, v. 92, p. 180–5, 1987.

MARANGHI, F. et al. Effects of the food contaminant semicarbazide following oral administration in juvenile sprague-dawley rats. *Food and chemical toxicology*, Elsevier, v. 47, n. 2, p. 472–479, 2009.

MIRANDA, D. et al. Modelado del comportamiento de ratas en laberinto en cruz elevado basado en redes neuronales artificiales. *Rev Colomb Fsica*, v. 41, p. 406–8, 2009.

MOBBS, D. et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontalperiaqueductal gray shifts in humans. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 317, n. 5841, p. 1079–1083, 2007.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, n. 4, p. 254–260, ago. 1955. ISSN 0021-9940. PMID: 13252152. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13252152>.

MOREIRA, F. et al. Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? *Neural Plas*, v. 2009, p. 625469, 2009.

NEWMAN, M. Power laws, pareto distributions and zipfs law. *Contemp Phys*, v. 46, p. 323–51, 2005.

OHL, F. Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, v. 3, n. 4-5, p. 233–238, dez. 2003. ISSN 15662772. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve-/pii/S1566277203000847">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve-/pii/S1566277203000847</a>.

PAWLAK, C. et al. The elevated plus-maze test: differential psychopharmacology of anxiety-related behavior. *Emot Rev*, v. 4, p. 98–115, 2012.

PEDHAZUR, E.; PEDHAZUR, S. L. Measurement, design, and analysis: an integrated approach. 1st. ed. New York: Taylor & Francis, 1991.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 14, n. 3, p. 149–167, ago. 1985. ISSN 0165-0270. PMID: 2864480. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480</a>>.

RODGERS, R. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav*, v. 68, p. 47–53, 1999.

RODGERS, R. J.; DALVI, a. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuros*cience and biobehavioral reviews, v. 21, n. 6, p. 801–10, nov. 1997. ISSN 0149-7634. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415905">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415905</a>>.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology*, *biochemistry*, and *behavior*, v. 52, n. 2, p. 297–303, out. 1995. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577794">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577794</a>>.

SALUM, C.; MORATO, S.; SILVA, A. C. Roque-da. Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society*, v. 13, n. 1, p. 21–29, 2000.

SALUM, C.; SILVA, A. C. Roque-da; MORATO, S. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, v. 63, n. 2, p.

87–93, jun. 2003. ISSN 03766357. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376635703000342">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376635703000342</a>>.

SCHWARZ, G. E. Estimating the dimension of a model. Ann Stat, v. 6, p. 461–464, 1978.

SETEM, J. et al. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 62, n. 3, p. 515– 21, mar. 1999. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov-/pubmed/10080245">http://www.ncbi.nlm.nih.gov-/pubmed/10080245</a>>.

SIEGEL, N. J. C. J. S. Estatística Não-Paramétrica Para Ciências do Comportamento. [S.l.]: Artmed, 2006.

SILVA, R. C.; BRANDÃO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 65, n. 2, p. 209–16, fev. 2000. ISSN 0091-3057. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672971">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672971</a>.

SIMPSON, J. et al. Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*, v. 37, p. 227–36, 2012.

TEJADA, J. et al. Characterization of rat behavior in the elevated plus-maze using a directed graph. *Journal of neuroscience methods*, v. 184, n. 2, p. 251–255, 2009.

TEJADA, J. et al. Characterization of the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze with Markov chains. *Journal of neuroscience methods*, v. 193, n. 2, p. 288–95, 2010.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berlin)*, v. 111, p. 323–31, 1993.

VIOLLE, N. et al. Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, v. 203, p. 35–42, 2009. WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WALL, P.; MESSIER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, v. 114, p. 199–212, 2000.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 25, n. 3, p. 275– 86, maio 2001. ISSN 0149-7634. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov-/pubmed/11378181">http://www.ncbi.nlm.nih.gov-/pubmed/11378181</a>.

ZHAO, L. C.; DOREA, C. C. Y.; GONÇALVES, C. R. On determination of the order of a markov chain. *Stat Inf Stoch Proc*, v. 4, p. 273–282, 2001.

# Apêndice A

## CONCEITOS DE PROBABILIDADE

Este apêndice se dedica a expor as definições e fornecer breves explicações acerca dos conceitos usados na descrição do modelo markoviano, base desta pesquisa.

## A.1 Conceitos Teóricos

Chamamos de experimento aleatório um experimento para o qual não sabemos qual será o resultado antes de sua realização. Podemos apenas elencar quais os resultados possíveis, associando-os às suas respectivas chances de ocorrência.

Exemplos clássicos de experimentos aleatórios são o lançamento de um dado, lançamento de uma moeda, sorteios em geral, jogos de roletas, os mais diversos jogos de baralho, entre outros.

**Definição A.1.1 (Espaço Amostral)** É chamado de espaço amostral o conjunto de todos os resultados possíveis de um experimento aleatório. Usaremos  $\Omega$  para simbolizá-lo.

No caso do lançamento de um moeda, o espaço amostral é  $\Omega = \{cara, coroa\}$ . No caso do lançamento de uma moeda seguido pelo lançamento de um dado, o espaço amostral é  $\Omega = \{(cara, 1), (cara, 2), (cara, 3), (cara, 4), (cara, 5), (cara, 6), (coroa, 1), (coroa, 2), (coroa, 3), (coroa, 4), (coroa, 5), (coroa, 6)\}.$ 

**Definição A.1.2 (Evento)** Evento é um subconjunto do espaço amostral, composto por todos os elementos que satisfazem uma determinada propriedade desejada.

No caso de um evento conter apenas um elemento ele será chamado de *evento elementar*.

Como exemplo podemos citar evento A: "laçarmos uma moeda obtermos *cara*", onde o evento seria  $A = \{cara\}$ , que é um evento elementar. Se considerarmos o experimento aleatório lançar um dado e uma moeda, e considerarmos o evento B: "sair *cara* e um número impar, ou *coroa* e um número par", este é dado pelo evento  $B = \{(cara, 1), (cara, 3), (cara, 5), (coroa, 2), (coroa, 4), (coroa, 6)\}.$ 

**Definição A.1.3 (Probabilidade)** Probabilidade é uma função, denotada por  $\mathbb{P}$ , que associa a cada evento de  $\Omega$  as chances de sua ocorrência e satisfaz os seguintes axiomas:

 $(A_1)\mathbb{P}(A) \geq 0$  para todo  $A \subset \Omega$ ;

 $(A_2)\mathbb{P}(\Omega) = 1;$ 

 $(A_3)$  Para uma sequência infinita de eventos disjuntos, temos que:

$$\mathbb{P}\left(\bigcup_{i=1}^{\infty} A_i\right) = \sum_{i=1}^{\infty} \mathbb{P}(A_i).$$

**Exemplo A.1.1** Como exemplo pensemos no laçamento de uma moeda honesta.

Se n(A) representa o número de elementos em um conjunto A então podemos definir a probabilidade de um evento como  $\mathbb{P}(A) = \frac{n(A)}{n(\Omega)}$ , pois essa função respeita todos os axiomas da definição A.1.3.

**Definição A.1.4 (Espaço de Probabilidade)** Espaço de probabilidade é a tripla  $(\Omega, \mathcal{A}, \mathbb{P})$ , onde  $\Omega$  é o espaço amostral,  $\mathcal{A}^1$  é um conjunto de eventos de  $\Omega$  e  $\mathbb{P}$  é a probabilidade de ocorrência de cada evento de  $\mathcal{A}$ .

**Definição A.1.5 (Probabilidade Condicional)** Probabilidade condicional é a probabilidade de ocorrência de um evento, conhecendo-se a ocorrência de um outro evento. É denotada por  $\mathbb{P}(A|B) = \frac{\mathbb{P}(A \cap B)}{\mathbb{P}(B)}$  com  $\mathbb{P}(B) \neq 0$ , onde A é o evento de interesse e B é o evento que já se sabe que ocorreu.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Se  $\Omega$  for finito  $\mathcal{A}$  pode ser o conjunto de todos os eventos de  $\Omega$ . Senão  $\mathcal{A}$  é um conjunto com determinadas propriedades, chamado de  $\sigma$ -álgebra.

**Exemplo A.1.2**No caso do lançamento de duas moeda, por exemplo, se soubermos que uma das moedas honestas resultou em cara, ou seja B = $\{(cara, cara), (cara, coroa), (coroa, cara)\}$  e desejarmos saber a probabilidade do evento "as duas moedas darem resultados diferentes", ou seja, queremos a probabilidade de  $A = \{(cara, coroa), (coroa, cara)\}, \mathbb{P}(A|B) = \frac{\mathbb{P}(A \cap B)}{\mathbb{P}(B)} = \frac{2}{3}.$ 

No exemplo A.1.2 podemos notar que a informação sobre a ocorrência do evento B altera a probabilidade de ocorrência do evento A, ou seja,  $\mathbb{P}(A|B) \neq \mathbb{P}(A)$ . Porém, nem sempre isso ocorre. Quando a ocorrência de um evento não altera a probabilidade de ocorrência de outro, dizemos que esses eventos são independentes entre si. Ou de maneira mais formal:

**Definição A.1.6 (Eventos Independentes)** Sejam  $A \in B$  eventos de um espaço amostral. Dizemos que eles são independentes, se tivermos  $\mathbb{P}(A|B) = \mathbb{P}(A) \cdot \mathbb{P}(B)$ .

Generalizando esta definição para qualquer quantidade n de eventos, temos:

**Definição A.1.7 (Eventos Coletivamente Independentes)**  $Sejam A_1, A_2, ..., A_n$ , tal que  $n \ge 2$ , eventos de um espaço amostral. Eles são chamados de coletivamente independentes se:  $\mathbb{P}(A_{i_1} \cap A_{i_2} \cap \cdots \cap A_{i_m}) = \mathbb{P}(A_{i_1}) \cdot \mathbb{P}(A_{i_2}) \cdots \mathbb{P}(A_{i_m})$ , para todo  $1 \le i_1 \le i_2 \le \cdots \le i_m \le n$  para todo  $m \ge 2$ .

#### A.2 Variável Aleatória

**Definição A.2.1 (Variável Aleatória)** Variável aleatória é uma função que associa um número real a cada elemento do espaço amostral  $\Omega$ .

A uma variável aleatória está associada uma distribuição de probabilidade definida a seguir:

**Definição A.2.2**Se denotarmos por  $\{X = x\}$  o conjunto de elementos de  $\Omega$  que são levados por X ao valor  $x \in \mathbb{R}$ , então  $p(x) = \mathbb{P}(X = x)$  será chamada de distribuição de probabilidade da variável aleatória X.

Exemplo A.2.1 (Bernoulli) Ao lançarmos um dado honesto vamos definir a se-

guinte variável aleatória:

$$X = \begin{cases} 0, & caso \ saia \ um \ n\'umero \ par \\ 1, & caso \ saia \ um \ n\'umero \ impar \end{cases}$$

onde  $\mathbb{P}(X=0) = \mathbb{P}(X=1) = \frac{1}{2}$ 

**Definição A.2.3 (Vetor Aleatório Bidimensional)** Sejam  $X \, e \, Y$  duas variáveis aleatórias, então chamamos o vetor (X, Y) de vetor aleatório bidimensional.

Observamos aqui que embora a definição tenha sido escrita em termos de um vetor bidimensional, ela pode ser facilmente adaptada para qualquer número finito de variáveis aleatórias. A escolha desta dimensionalidade se deve unicamente para efeitos de simplicidade nas explicações.

**Definição A.2.4 (Distribuição de Probabilidade Conjunta)** Dado o vetor aleatório (X, Y), vamos denotar por (x, y) cada valor que ele pode assumir. A este valor está associada uma probabilidade  $\mathbb{P}(X = x, Y = y) = \mathbb{P}(\{X = x\} \cap \{Y = y\})$ , que será denotada por p(x, y). O conjunto dos valores de p(x, y) para todo (x, y) recebe o nome de distribuição de probabilidade conjunta.

**Exemplo A.2.2**Suponha que estamos interessados em estudar famílias com 2 filhos. Definamos:

X = n i mero de filhos homens $Y = \begin{cases} 1, & \text{se o } 1^\circ \text{ filho for homem} \\ 0, & \text{se o } 1^\circ \text{ filho for mulher} \end{cases}$ 

Com essas informações, supondo que cada composição tenha a mesma probabilidade, e representando por H e M filhos homens e mulheres respectivamente, temos:

$elementos \ de \ \Omega$	Probabilidade	X	Y
HH	1/4	2	1
HM	1/4	1	1
MH	1/4	1	0
MM	1/4	0	0

Obtidos esses resultados podemos representar a distribuição conjunta do vetor aleatório (X, Y) por:

	X = 0	X = 1	X = 2
Y = 0	1/4	1/4	0
Y = 1	0	1/4	1/4

De posse da distribuição de probabilidade conjunta de um vetor aleatório (X, Y), definimos a distribuição de probabilidade marginal da variável aleatória X do vetor, como  $\sum_{y} p(x, y)$ , denotada por  $p_X(x)$ . Usemos o exemplo anterior para facilitar o entendimento.

**Exemplo A.2.3***Retomando o que fizemos no exemplo A.2.2, podemos definir a dis*tribuição de probabilidade marginal de X para o vetor lá descrito como:

$$p_X(0) = \sum_{y=0}^{1} p(0,y) = p(0,0) + p(0,1) = \frac{1}{4} + 0 = \frac{1}{4}$$

$$p_X(1) = \sum_{y=0}^{1} p(1,y) = p(1,0) + p(1,1) = \frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{2}{4}$$

$$p_X(2) = \sum_{y=0}^{1} p(2,y) = p(2,0) + p(2,1) = 0 + \frac{1}{4} = \frac{1}{4}$$
Bem como a distribuição de probabilidade marginal de Y que será:
$$p_Y(0) = \sum_{x=0}^{2} p(x,0) = p(0,0) + p(1,0) + p(2,0) = \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + 0 = \frac{1}{2}$$

$$p_Y(1) = \sum_{x=0}^{2} p(x,1) = p(0,1) + p(1,1) + p(2,1) = 0 + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} = \frac{1}{2}$$

**Definição A.2.5 (Distribuição Condicional)** Dado o vetor aleatório (X, Y), definimos a distribuição de probabilidade condicional de  $\{X = x\}$  dado que  $\{Y = y\}$ ocorreu por

$$p_{X|Y}(x|y) = \mathbb{P}(X = x|Y = y) = \frac{\mathbb{P}(X = x, Y = y)}{\mathbb{P}(Y = y)}, \ se \ \mathbb{P}(Y = y) > 0$$

Agora podemos definir a independência entre variáveis aleatórias.

**Definição A.2.6 (Dependência de Variáveis Aleatórias)** Dado um vetor aleatório (X,Y) dizemos que as variáveis aleatórias que o compõe são independentes caso  $p(x,y) = p_X(x) \cdot p_Y(y)$  para todos os pares de valores (x,y) que possam ser assumidos pelo vetor. Caso contrário as variáveis são ditas dependentes.

A extensão desta condição verificada para n variáveis aleatórias seria  $\mathbb{P}(X_1 = x_1, X_2 = x_2, \cdots, X_n = x_n) = \prod_{i=1}^n p_{X_i}(x_i)$  para todos os valores  $x_i$ .

**Exemplo A.2.4***O vetor descrito no exemplo A.2.2* é composto por duas variáveis aleatórias dependentes, pois  $p(0,1) = 0 \neq \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{2} = p_X(0) \cdot p_Y(1)$ , por exemplo.

## A.3 Inferência em Processos Estocásticos

Seja  $S = \{s_1, s_2, \dots s_m\}$  o espaço de estados de um processo estocástico que se pretende modelar. Seja  $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots x_n), x_i \in S, 1 \leq i \leq n$  uma trajetória observada deste processo estocástico. Então a probabilidade de  $\mathbf{x}$  ocorrer será  $\mathbb{P}(X = \mathbf{x}) = \mathbb{P}(X_1 = x_1, X_2 = x_2, \dots X_n = x_n).$ 

Se supusermos que o sistema assume estados de forma totalmente independente do que já assumiu antes, então uma forma de modelar esse Processo Estocástico é considerar que a trajetória amostrada seja a realização de uma sequência de variáveis aleatórias independentes,  $X_1, X_2, \dots X_n$ , e portanto  $\mathbb{P}(X = \mathbf{x}) = \prod_{k=1}^n \mathbb{P}(X_k = x_k)$ . Seja  $p_j = \mathbb{P}(X_k = j), j \in S, 1 \leq k \leq n$ , então  $\mathbb{P}(X = \mathbf{x}) = \prod_j p_j^{n_j}$ , onde  $n_j$  é a quantidade de vezes que o estado j aparece na trajetória amostrada,  $\mathbf{x}$ . Neste caso o vetor  $\mathbf{p}$  composto pelos valores de  $p_j$  representa a distribuição de probabilidades que desejamos estimar a partir de uma amostra de observações do processo. A função de verossimilhança  $L(\mathbf{p})$  do parâmetro  $\mathbf{p}$  (dada a saída  $\mathbf{x}$ ) é a probabilidade do valor observado como função de um parâmetro desconhecido. O valor de  $\mathbf{p}$  que maximiza essa função é chamado estimador de máxima verossimilhança, denotado por  $\mathbf{\hat{p}}$ . Tal valor será dado por  $\hat{p}_j = \frac{n_j}{n}$ ,  $\forall j \in S$ .

Outra suposição possível seria de que o processo se trata de uma cadeia de Markov. Neste caso a probabilidade de X assumir cada valor  $j \in S$  deve levar em consideração o estado anterior na sequência. Se *i* denotar o estado anterior,  $n_{ij}$ denotar a quantidade de vezes que o processo passou do estado *i* para o estado *j* na sequência  $\mathbf{x}$ , e  $p_{ij} = \mathbb{P}(X_k = j | X_{k-1} = i)$ , então podemos de forma análoga à anterior chegar à  $\mathbb{P}(\mathbf{x}) = \mathbb{P}(X_1 = x_1) \cdot \prod_{k=2}^{n} \mathbb{P}(X_k = x_k | X_{k-1} = x_{k-1}) = \mathbb{P}(X_1 = x_1) \cdot \prod_{ij} p_{ij}^{n_{ij}}$ . Denotando a matriz composta pelos elementos  $p_{ij}$  por  $\mathbf{P}$ , teremos igualmente a função  $L(\mathbf{P})$ , e o valor de  $\mathbf{P}$  que a maximiza será o novo estimador  $\hat{\mathbf{P}}$ . Tal valor será dado por  $\hat{p_{ij}} = \frac{n_{ij}}{n_{i.}}, \forall i, j \in S$ , onde  $n_i$  é a quantidade de vezes que o processo sai do estado *i* para ir para qualquer estado.

Com o objetivo de escolher o melhor dentre estes dois estimadores, tomamos a razão entre as funções de verossimilhança maximizadas  $\left(\frac{L(\hat{\mathbf{P}})}{L(\hat{\mathbf{p}})}\right)$ , aplicamos à ela o logaritmo natural e multiplicamos por 2, para obter  $\lambda = 2(\ln L(\hat{\mathbf{P}}) - \ln L(\hat{p}))$ . Isto porque, sabemos que sob a hipótese nula de independência entre as variáveis aleatórias a estatística  $\lambda$  tem distribuição  $\chi^2$  com graus de liberdade dados pelo tamanho do espaço de estados menos um (GUTTORP, 1995), desde que *n* seja grande. Então, podemos utilizar isto para aplicar o teste de hipóteses:

 $H_0$ :<br/>a sequência  $x_1, \cdots x_n$  é uma realização de variáveis aleatórias independentes<br/>  $H_1$ :<br/>a sequência  $x_1, \cdots x_n$  é uma realização de uma cadeia de Markov

# Apêndice $\mathbf{B}$

# MODELO DISCRETO COM FUGA

Como um complemento ao que foi apresentado no capítulo 2, foi proposto um outro modelo, apresentado neste apêndice. Este modelo trata-se apenas de uma abordagem alternativa àquele e não apresentou diferenças relevantes nos resultados com relação aos daquele modelo. Devido a este fato, decidiu-se separá-lo em um apêndice, onde pode ser visto como um complemento ao que se encontra no capítulo 2.

O embasamento teórico necessário para a compreensão deste modelo já foi dado na seção 2.1. Uma descrição dos dados analisados, que explica o processo para sua obtenção e a divisão dos grupos, também já foi dada na seção 2.2. Este apêndice se inicia com a construção do modelo, que é apresentada na seção B.1. E, em seguida, na seção B.2, apresenta algumas comparações de seus resultados com aqueles mostrados no capítulo 2.

### B.1 Construção do Modelo

Uma vez que o rato se encontre em um braço aberto, é possível que ele escape do labirinto. Nesta situação o protocolo experimental, utilizado pelo laboratório que forneceu os registros, determina que o rato seja colocado de volta na posição central. Desta forma, além das transições consideradas possíveis em Tejada et al. (2010), também foram consideradas as transições de qualquer estado no braço aberto para o centro. Isto foi feito devido à suspeita de que tais fugas do LCE possam conter



Figura B.1: Divisão do chão do labirinto em quadrados a serem tratados como estados de um processo estocástico, conforme mostrado anteriormente na figura 1.2. Esta figura apenas acrescenta àquela as novas transições possíveis e as probabilidades de transições entre os estados.

informações relevantes para o estudo. Tal suspeita surgiu a partir dos resultados de Arabo et al. (2014), que mostrou que ratos expostos à drogas ansiolíticas teriam mais chances de pular do labirinto, ao contrário do que se pensava. Além disso, neste trabalho só vamos analisar os grupos ansiolíticos, porque a maioria dos grupos ansiogênicos não apresentou fugas.

As transições possíveis para este modelo podem ser observadas na figura B.1. O programa implementado em Java para a construção e cálculos sobre o modelo anterior (capítulo 2) foi todo readaptado para essa nova proposta de modelo. Tal adaptação foi inserida no código e o mesmo programa foi utilizado aqui.

## B.2 Resultados do Modelo

O grupo controle, assim como o tratado com MDZ não apresentaram nenhuma fuga, por isso suas matrizes são idênticas às do modelo apresentado no capítulo 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	0,96	0	0	0	0,04	0	0	0	0	0 )
2	0,45	0	0, 54	0	0	0,01	0	0	0	0	0
3	0	0, 49	0	0, 49	0	0,02	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 51	0	0, 49	0,00	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 51	0	0, 49	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 46	0	0, 54	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0, 57	0	0, 43
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,00	0 /

Figura B.2: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos tratados com a droga ansiolítica CDP considerando as fugas dos ratos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	( 0	0,97	0	0	0	0,03	0	0	0	0	0
2	0,37	0	0,62	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0, 49	0	0, 50	0	0,01	0	0	0	0	0
4	0	0	0, 50	0	0, 50	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0, 44	0	0, 56	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0, 48	0	0, 52	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0, 49	0	0, 51	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0,60	0	0, 40
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 /

Figura B.3: Matriz de probabilidades de transições calculada para o grupo de ratos ansiolítico, composto pelos grupos CDP e MDZ, considerando as fugas dos ratos.

(figuras 2.6 para o grupo controle e 2.4 para o grupo MDZ). A matriz de probabilidades de transição geradas para o grupo de ratos tratados com o ansiolítico CDP é apresentada na figura B.2. A figura B.3 apresenta a matriz de probabilidades de transição geradas para o grupo de todos os ratos tratados com ansiolíticos (CDP e MDZ).

Os tempos médios de primeira visita a cada estado partindo da posição central (estado 6) foram calculados de forma semelhante à do modelo anterior. Porém aqui, o sistema 2.6 foi trocado pelo sistema B.1, descrito a seguir, para adicionar a cada equação o componente relativo à nova transição possível.

$$t_{1} = 1 + p_{1,2}t_{2} + p_{1,6}t_{6}$$

$$t_{2} = 1 + p_{2,1}t_{1} + p_{2,3}t_{3} + p_{2,6}t_{6}$$

$$t_{3} = 1 + p_{3,2}t_{2} + p_{3,4}t_{4} + p_{3,6}t_{6}$$

$$t_{4} = 1 + p_{4,3}t_{3} + p_{4,5}t_{5} + p_{4,6}t_{6}$$

$$t_{5} = 1 + p_{5,4}t_{4} + p_{5,6}t_{6}$$

$$t_{6} = 1 + p_{6,5}t_{5} + p_{6,7}t_{7}$$

$$t_{7} = 1 + p_{7,6}t_{6} + p_{7,8}t_{8}$$

$$t_{8} = 1 + p_{8,7}t_{7} + p_{8,9}t_{9}$$

$$t_{9} = 1 + p_{9,8}t_{8} + p_{9,10}t_{10}$$

$$t_{10} = 1 + p_{10,9}t_{9} + p_{10,11}t_{11}$$

$$t_{11} = 1 + p_{11,10}t_{10} = 1 + t_{10}$$
(B.1)

Apesar da inclusão das fugas, os tempos calculados a partir deste modelo não apresentaram diferença em relação aos encontrados no modelo anterior. Desta forma, não seria justificado apresentar e discutir aqui seus resultados, uma vez que a discussão seria idêntica àquela apresentada para o modelo que desconsidera as fugas do animal (seção 2.4). Ainda assim, foram calculadas as razões entre esses tempos da mesma forma que havia sido feito com o modelo anterior.

Uma vez que o grupo controle não apresenta diferenças no modelo, pois seus ratos não apresentam fugas, seus gráficos não são apresentados. Para o grupo ansiolítico, esses valores são mostrados na figura B.4 para cada distância *d* da posição central. Assim como no modelo que desconsidera as fugas do animal, neste modelo também se observa que os valores das razões são aproximadamente os mesmos para qualquer distância quando considerado um único grupo. Pode-se notar na figura que os resultados são bastante semelhantes aos observados para o modelo sem fuga ("boxes"



Figura B.4: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados que se encontram à mesma distância do centro, calculadas para cada rato do grupo ansiolítico a partir do modelo que considera as fugas do animal como transições válidas. Os boxes representados em tracejado, são reproduções daqueles mostrados na figura 2.24 (modelo sem fuga), que estão reproduzidos aqui apenas para facilitar a comparação entre os modelos.

tracejados). Os valores calculados para o modelo que considera as fugas, apenas aparenta ser mais homogêneo do que aquele que as desconsidera. O que é notado tanto comparando-se as suas caixas quanto as suas barras externas.

A figura B.5, apresenta os valores encontrados para as posições mais próximas do centro (d = 1) em cada subgrupo do grupo ansiolítico, calculados a partir do modelo com fuga. Adicionalmente, com o intuito de facilitar a comparação entre os dois modelos, a figura representa em tracejado os valores calculados (para CDP) para o modelo sem fugas. Uma vez que o grupo tratado com MDZ não apresenta fuga, seus valores são idênticos em ambos os modelos, sendo, portanto, representado apenas uma vez. Ao comparar essas razões calculadas a partir do modelo que considera as fugas para uma mesma distância em grupos submetidos a diferentes tratamentos, também são encontradas diferenças, como ocorria no modelo sem fugas . Porém, comparando os dois modelos, pode-se notar que estas diferenças são ligeiramente



Figura B.5: Box-plot da divisão dos tempos médios de primeira visita para estados vizinhos do centro, calculadas para cada rato de cada subgrupo ansiolíticos a partir do modelo que considera as fugas do animal como transições válidas. O box representado em tracejado, reproduz aquele do grupo CDP mostrado na figura 2.27 (modelo sem fuga), que está reproduzido aqui apenas para facilitar a comparação entre os modelos.

menos importantes do que as encontradas no modelo que as desconsidera.

Foram calculadas, ainda, a distribuição de probabilidades estacionária para os grupos controle, ansiolítico e ansiogênico, bem como para cada subgrupo ansiolítico. Mais uma vez, os resultados se mostraram muito parecidos com os obtidos no modelo que desconsidera as fugas, já representados nas figuras 2.13 e 2.15, e discutidos na seção 2.4. Por este motivo não foram representados nesta seção.

A título de comparação a figura B.6 mostra os valores calculados para os ratos dos grupos controle, ansiolítico e ansiogênico, enquanto os subgrupos ansiolíticos são apresentados na figura B.7. Na primeira, figura B.6, nota-se uma grande semelhança entre os valores calculados a partir do modelo que considera as fugas e aqueles calculados a partir do modelo que as desconsidera. Portanto, assim como no modelo sem as fugas, aqui também o grupo ansiolítico apresenta uma separação razoável dos demais grupos, enquanto os outros dois apresentam muita interseção.



Figura B.6: Diferença das probabilidades estacionárias dos estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto) para cada tipo de droga, calculadas a partir do modelo que considera as fugas do animal como transições válidas. Os boxes representados em tracejado, são reproduções daqueles mostrados na figura 2.17 (modelo sem fuga), que estão reproduzidos aqui apenas para facilitar a comparação entre os modelos.

Comparando-se os dois grupos ansiolíticos (figura B.7) nota-se ainda uma separação razoável entre eles, uma vez que a mediana de cada grupo se encontra fora da região englobada pela caixa do outro grupo, assim como ocorria no modelo que desconsidera as fugas. Porém, desta vez os valores apresentaram uma pequena diferença de um modelo para o outro, ficando novamente o modelo que desconsidera as fugas como melhor alternativa para distinguir entre os tratamentos.



Figura B.7: Diferença das probabilidades estacionárias dos estados 6 (posição central do LCE) e 5 (início do braço aberto) para cada tipo de droga ansiolítica, calculadas a partir do modelo que considera as fugas do animal como transições válidas. Os boxes representados em tracejado, são reproduções daqueles mostrados na figura 2.18 (modelo sem fuga), que estão reproduzidos aqui apenas para facilitar a comparação entre os modelos.