

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA (IP - USP)

HENRIQUE SOUZA REIS

**Efeitos da Cetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de
seu efeito reforçador**

São Paulo

2023

HENRIQUE SOUZA REIS

Efeitos da Cetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de seu
efeito reforçador

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências pelo programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento.

Área de concentração: Neurotransmissores e comportamento

Orientador: Prof. Dr. Fábio Leyser Gonçalves

São Paulo

2023

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

Catálogo na publicação

Biblioteca Dante Moreira Leite

Instituto de Psicologia da Universidade de São

Paulo Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza Reis, Henrique

Efeitos da Cetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de seu efeito reforçador / Henrique Souza Reis; orientador Fábio Leyser Gonçalves. -- São Paulo, 2023.

54 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Condicionamento clássico. 2. Psicofarmacologia . 3. Cetamina. I. Leyser Gonçalves, Fábio , orient. II. Título.

Nome: REIS, Henrique S.

Título: Efeitos da Cetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de seu efeito reforçador.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências pelo programa de pós-graduação em neurociências e comportamento

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

Prof(a). Dr(a):

Instituição:

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar os meus agradecimentos aos meus pais, Elisabete e Edson, por terem oferecido todo o apoio, cuidado e carinho ao longo de toda a minha trajetória. Sem a presença de vocês, não teria desenvolvido o gosto pela leitura, pelo aprendizado e não teria encarado os estudos como um valor fundamental e estruturante na construção da minha identidade. É com imensa felicidade e realização que me percebo como o primeiro de minha família, em incontáveis gerações, a ter tido a oportunidade e as condições mínimas para realizar um mestrado acadêmico em uma universidade como a USP. Sou grato a cada pessoa que veio antes de mim e que contribuiu para a formação dos valores que me foram passados, assim como a cada pessoa que me incentivou no caminho da educação.

Gostaria também de agradecer ao apoio dos meus irmãos, Bruno e Ricardo, que, junto com meus pais, foram o suporte necessário para a decisão e para toda a jornada que escolhi ao realizar este trabalho, e à Laís, por ter me apoiado nos longos finais de semana, por sua companhia durante o processo de redação desta dissertação, na coleta de dados e por ter me ouvido falar deste projeto muito mais vezes do que gostaria. Agradeço também à Thamiris pela magnífica tradução do artigo referente a este projeto; sem dúvida, só consegui cumprir os prazos devido à sua agilidade e competência no processo de tradução.

Ao meu orientador, Fábio, gostaria, além de agradecer todo o apoio, amizade e orientação desde os tempos de graduação, de expressar a minha imensa gratidão por todo o acolhimento nos momentos de crise e por sempre ter sido um modelo de admiração e respeito pessoal e profissional. Como você diz: "quando crescer, quero ser como você". Se não fosse por toda esta abertura para aceitar as ideias mais inusitadas de pesquisa e pela relação que construímos ao longo destes quase 7 anos, eu não teria me aventurado pelo laboratório e aceitado o desafio que é fazer um mestrado com coleta em outra cidade. Obrigado por ter me ensinado a ser o psicólogo que sou hoje e por despertar em mim essa paixão pela pesquisa

básica. Falando em laboratório, gostaria de realizar um agradecimento e uma dedicatória especial para Mirela, Fernanda e Isabela, por toda a amizade, ajuda e companhia nestes anos de laboratório; sem dúvida, vocês tornaram os meus dias de coleta muito mais animados e felizes. Meus agradecimentos a todos os integrantes do LACEN pelas ricas discussões, feedbacks e contribuições realizadas, e a todas as pessoas que não tiveram seus nomes citados aqui, mas que, sem o seu trabalho, eu não teria realizado o meu, como as equipes de secretaria, administração e manutenção tanto da UNESP quanto da USP.

Por fim, encerro os meus agradecimentos à Capes, pois este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e aos meus pais, que forneceram apoio financeiro igualmente necessário para a realização deste projeto.

RESUMO

REIS, H. S. **Efeitos da Cetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de seu efeito reforçador.** 2023. Dissertação (Mestrado) -Instituto de psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Estudos recentes indicam que a Cetamina, um antagonista não competitivo de receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), quando aplicada em doses subanestésica, exibe efeito antidepressivo. Este efeito pode ser observado, tanto em ensaios clínicos, como em estudos experimentais utilizando testes de triagem e modelos animais que simulam traços/sintomas característicos deste transtorno. Outros estudos apontam que a ação deste fármaco está intimamente ligada à estimulação de processos de sinaptogênese em diversas áreas do sistema nervoso central, estando associada ao aumento da atividade glutamatérgica e na concentração de receptores AMPA. Estes receptores em conjunto com receptores NMDA, parecem estar relacionados ao processo de aprendizagem do reforço condicionado. Diante da falta de estudos que descrevam de maneira mais detalhada as ações imediatas e prolongadas deste fármaco no processo de aprendizagem de reforçadores condicionados, este estudo propõe-se a avaliar a influência da aplicação da Cetamina sobre esse processo. Para este efeito, foram avaliados os impactos da aplicação da Cetamina (10mg/kg), 24 horas ou 30 minutos, antes das sessões de condicionamento ou de teste. Foram utilizados oito grupos de 10 ratos machos de linhagem wistar cada. Sendo quatro grupos experimentais para os quatro cenários possíveis de aplicação do fármaco, em que a Cetamina foi aplicada 24 horas ou 30 minutos antes das sessões de condicionamento ou 24 horas ou 30 minutos antes das sessões teste, assim como seus respectivos grupos Controle. Foi observado que a Cetamina, quando aplicada 30 minutos antes da sessão de teste, parece exercer um efeito positivo na eficácia de reforçadores condicionados

previamente aprendidos. No entanto devido ao estresse provocado pela imobilização e aplicação do fármaco, este efeito poderia corroborar uma possível ação ansiolítica promovida por este fármaco. Já o efeito tardio da aplicação da Cetamina, com 24 horas de antecedência, nas sessões de teste pareceu impactar negativamente na eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos. O efeito da aplicação de Cetamina de forma imediata ou tardia na etapa de condicionamento não pareceu exercer impacto significativo sobre este processo.

Palavras-chave: Condicionamento clássico. Psicofarmacologia. Cetamina.

ABSTRACT

REIS, H. S. **Effects of Ketamine on the learning of conditioned reinforcers and modulation of its reinforcing effect.** 2023. Dissertação (Mestrado) -Instituto de psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Recent data indicate that Ketamine, a non-competitive antagonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptors, when applied in subanesthetic doses, has an antidepressant effect. This effect can be observed both in clinical trials and in Experimental studies using screening tests and animal models that simulate traits/symptoms characteristic of this disorder. Other studies indicate that the action of this drug is closely linked to the stimulation of synaptogenesis processes in various areas of the central nervous system, being associated with an increase in glutamatergic activity and in the concentration of AMPA receptors. These receptors, together with NMDA receptors, seem to be related to the learning process of conditioned reinforcement. Given the lack of studies describing in more detail the immediate and prolonged actions of this drug on the learning process of conditioned reinforcers, this study aims to evaluate the influence of the application of Ketamine on this process. To this end, the impact of applying Ketamine (10mg/kg) 24 hours or 30 minutes before the conditioning or test sessions was evaluated. Eight groups of 10 male Wistar rats each were used. There were four Experimental groups for the four possible drug application scenarios, in which Ketamine was applied 24 hours or 30 minutes before the conditioning sessions or 24 hours or 30 minutes before the test sessions, as well as their respective control groups. It was observed that Ketamine, when applied 30 minutes before the test session, seems to have a positive effect on the effectiveness of previously learned conditioned reinforcers. However, due to the stress caused by the immobilization and application of the drug, this effect could corroborate a possible anxiolytic action promoted by this drug. On the other hand, the delayed effect of

applying Ketamine 24 hours before the test sessions seemed to have a negative impact on the effectiveness of previously learned conditioned reinforcers. The effect of applying Ketamine immediately or late in the conditioning stage did not seem to have a significant impact on this process.

Keywords: Classic conditioning, Psychopharmacology, Ketamine.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Cetamina como um fármaco antidepressivo.	2
Efeitos comportamentais da Cetamina em processos de reforço e modelos animais de depressão.	7
Mecanismos neurofisiológicos do reforço condicionado.....	9
Cetamina como possível moduladora de reforçadores condicionados.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS	25
Sujeitos.....	25
Materiais.....	25
Administração farmacológica	26
Procedimento.....	26
Análise estatística.....	29
RESULTADOS.....	30
Experimento 1	31
Discussão experimento 1.....	35
Experimento 2.....	36
Discussão experimento 2.....	41
Experimento 3	42
Discussão experimento 3.....	46
Experimento 4.....	47
Discussão experimento 4.....	52
DISCUSSÃO FINAL.....	55
Proposta para estudos futuros.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	71

INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior tem se mostrado um dos transtornos psiquiátricos de alta taxa de prevalência no mundo (Kessler et al., 2006; Otte et al., 2016). Dados epidemiológicos apresentam, para além da alta taxa, comorbidade com transtornos relacionados a substâncias, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, anorexia nervosa e bulimia nervosa. Pacientes deprimidos têm maiores chances de apresentar comportamentos suicidas (American psychiatric association, 2014).

Em função de sua alta prevalência e impacto na qualidade de vida das pessoas há uma intensa procura de recursos, tanto farmacológicos, como terapêuticos, para seu tratamento (Kessler et al., 2006). No entanto, mesmo com o avanço de tratamentos farmacológicos e observados seus efeitos positivos no Controle e remissão de sintomas depressivos é observado uma importante seletividade dos trabalhos que relatam a eficácia desses fármacos, tornando difícil a análise de sua real eficácia (Cipriani et al., 2018; Turner et al., 2022). Uma revisão recente (Turner et al., 2022) indica que em torno de 50% dos ensaios clínicos com resultados negativos, realizados para a validação de fármacos antidepressivos para uso comercial submetidos para a FDA (Food and Drug Administration), não são publicados. Em contrapartida, aproximadamente 100% de estudos com resultados positivos são publicados. Este viés de publicação de informações dificulta uma análise criteriosa da real eficácia destes fármacos, muito embora seja observado que este viés tem diminuído com o tempo. Mesmo assim, tem crescido a publicação de resultados que indicam efeitos positivos de antidepressivos quando comparado com placebo (Cipriani et al., 2018; Turner et al., 2022). Fontes mais antigas apontam que aproximadamente 64% da eficácia geral de antidepressivos é associada a efeito placebo, de forma que os efeitos terapêuticos promovidos exclusivamente pela ação do fármaco estão em torno de 36% (McKim & Hancock, 2011; Mora et al., 2011).

A maior parte dos antidepressivos está associada à modulação de monoaminas, como os IMAOs, antidepressivos tricíclicos e os inibidores de recaptação, sejam seletivos para serotonina, noradrenalina ou híbridos (McKim & Hancock, 2011; Stahl, 2014). Esses antidepressivos, normalmente, apresentam um intervalo de semanas entre o início do tratamento e o seu efeito terapêutico, dificultando a adesão ao tratamento. Embora ainda se estude os mecanismos de ação e o desenvolvimento de novos medicamentos dentro dessas categorias farmacológicas, há uma constante procura por alternativas farmacológicas que sejam mais eficazes e eficientes na remissão de sintomas depressivos, com início do efeito terapêutico em intervalo de tempo mais curto.

Cetamina como um fármaco antidepressivo.

Embora na atualidade tenha ocorrido grandes avanços naquilo que tange os efeitos terapêuticos de inibidores seletivos, Machado-Vieira et al. (2009) e Monteggia e Zarate (2015) apontam que uma nova geração de antidepressivos têm sido desenvolvida atuando em mecanismos e rotas neurais diferentes daquelas moduladas pelos receptores monoaminérgicos (Duman et al., 2012; Stahl, 2014). Dentre estes fármacos, um que se destaca devido à sua ação aguda e com efeito prolongado é o anestésico dissociativo Cetamina (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2012). Foi observado que este fármaco, quando administrado em doses subanestésicas, exerce efeito antidepressivo após algumas horas de aplicação podendo se estender até a 14 dias (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2012).

No Brasil, a Cetamina já possui o uso comercial homologado pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) na forma de cloridrato de escetamina, sob o nome comercial de Spravato®, tratando-se do enantiômero S da Cetamina. A sua via de aplicação é intranasal por meio de um dispositivo de uso único com duas cargas de 14mg do fármaco, sendo cada carga para uma das narinas. Dados referentes à posologia desse medicamento indicam que na fase de

indução são realizadas duas sessões de tratamento por semana com dosagens que variam entre 56 e 84 mg. Após este período inicial, entra-se na fase de manutenção, mantendo essa variação de dosagem, mas reduzindo a frequência de aplicação para uma vez por semana entre a quinta e oitava semana de tratamento. A partir da nona semana, a frequência de aplicação pode ser reduzida para uma vez a cada duas semanas. Sua biodisponibilidade é de 48% e sua metabolização varia entre 7 e 12 horas.

A ação da Cetamina, em sua mistura racêmica (S e R Cetamina) ocorre pelo antagonismo não competitivo de receptores glutamérgicos N-metil-D aspartato, conhecido pela sigla NMDA. Este fármaco entrou no mercado como anestésico com propriedades dissociativas devido a sua interferência nos sistemas sensoriais do sistema nervoso central (SNC) afetando a resposta neuronal à dor, respostas emocionais e, ao despertar, podendo provocar alucinações, sonhos vívidos e delírios (Gales & Maxwell, 2018; Haas & Harper, 1992; Mion & Villevieille, 2013). Dados referentes à farmacocinética deste composto indicam que possui uma meia vida de aproximadamente 2 - 3 horas (Clements & Nimmo, 1981; Mion & Villevieille, 2013). Quando aplicada em via endovenosa possui uma biodisponibilidade de 100%. Já sua aplicação de forma intranasal gera uma biodisponibilidade de 45% à 50%(Gales & Maxwell, 2018; Mion & Villevieille, 2013). Em doses subanestésicas, foi observado que este fármaco também estimula o processo de sinaptogênese: aumento do volume e concentração de proteínas nas espinhas dendríticas e fortalecimento de conexões já existentes, o que parece contribuir para ação antidepressiva prolongada (Li et al., 2011; Machado-Vieira et al., 2009; Viana et al., 2021).

A sinaptogênese é observada por meio do aumento da densidade de receptores AMPA, assim como do tamanho das protuberâncias das espinhas dendríticas nos neurônios piramidais localizados no córtex pré-frontal (Aleksandrova & Phillips, 2021; Duman et al., 2012; Li et al., 2011). Este fato é relevante para compreender a ação da Cetamina enquanto antidepressivo,

uma vez que em casos de depressão crônica observa-se uma atrofia de neurônios límbicos, do córtex pré-frontal e hipocampo. Essa atrofia é revertida pela aplicação subanestésica de Cetamina, que também é capaz de promover sinaptogênese em neurônios talâmicos e serotoninérgicos (Li et al., 2011).

Embora seu mecanismo de ação não tenha sido completamente compreendido entende-se que a ação da Cetamina se dá por meio de uma cascata de reações químicas e alterações metabólicas que perduram após a sua eliminação (Duman et al., 2012; Li et al., 2010; Machado-Vieira et al., 2009; Zanos et al., 2016). Estudos apontam que o efeito antidepressivo prolongado depende dos receptores AMPA e pode estar relacionado ao aumento da densidade desses receptores em neurônios pós-sinápticos (Koike et al., 2011; Maeng et al., 2008), além da ação de isômeros da Cetamina, em especial a S-Cetamina, no aumento da sinalização glutamatérgica no longo prazo (Zanos et al., 2016). Essas circuitarias estão presentes de forma generalizada no sistema nervoso central (Geisler et al., 2007; Kandel et al., 2014) e estão associadas ao desenvolvimento da plasticidade neuronal, funcionamento e manutenção de processos sensoriais e comportamentais como, por exemplo, o condicionamento respondente (Galaj & Ranaldi, 2021; Geisler et al., 2007).

O processo de plasticidade neuronal catalisado pela ação de longo prazo da Cetamina, discutido anteriormente, se sustenta a partir de duas hipóteses não excludentes; a primeira, de inibição indireta que descreve a ação da Cetamina na desinibição de neurônios piramidais por meio da inibição de neurônios GABAérgicos no córtex pré-frontal (CPF). A segunda hipótese, a de inibição direta, indica que a ação deste fármaco, em doses subanestésicas, resulta na inibição direta dos receptores NMDA destes neurônios piramidais. O processo de inibição direta produz o bloqueio da ativação tônica destes receptores, reduzindo a supressão da síntese de proteínas mediadas pelo fator de alongação eucariótica 2 (eEF2) (proteína associada a processos de neuroplasticidade) intensificando sua síntese. Em consequência a redução da

inibição desse fator trófico, uma cascata de reações sinaptogênicas, semelhantes às apontadas pela hipótese de inibição indireta, ocorrem (Aleksandrova & Phillips, 2021).

Em maiores detalhes, a primeira hipótese – de inibição indireta- se pauta em evidências de que a inibição de interneurônios GABAérgicos, principais neurônios inibidores no sistema nervoso central, produz como consequência um aumento na atividade de neurônios glutamatérgicos que, por sua vez, levaria ao aumento da sinalização glutamatérgica nos neurônios piramidais no córtex pré-frontal. Essa maior atividade destes neurônios resulta no aumento da atividade em circuitarias em regiões mesencefálicas e límbicas e no aumento da concentração de proteínas de membrana, em especial, receptores AMPA (Aleksandrova & Phillips, 2021).

A segunda hipótese sobre a causa do efeito antidepressivo de doses subanestésicas da Cetamina se dá pelo seu papel no antagonismo de receptores NMDA nos próprios neurônios piramidais. Este efeito produz a desinibição do eEF2 associado com uma maior predominância da ativação de receptores AMPA que resultam no aumento do influxo de cálcio intracelular. O aumento da concentração de íons de cálcio em conjunto com a atividade do eEF2 provoca processos plásticos mediados por fatores tróficos como mTOR (Li et al., 2010) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), resultando na síntese de novas proteínas de membrana (como aumento da concentração de receptores AMPA) e também no aumento da concentração de espinhas dendríticas, i.e, favorecendo o estabelecimento de novas conexões sinápticas (Aleksandrova & Phillips, 2021; Koike et al., 2011; Li et al., 2010; Maeng et al., 2008).

Essas duas hipóteses podem ser consideradas como complementares, pois a inibição de interneurônios GABAérgicos intensificaria a atividade de neurônios glutamatérgicos que, por sua vez, acentuaria o processo sinaptogênico descrito pela hipótese de inibição direta. Havendo maior volume de glutamato sendo secretado pela ausência da inibição exercida por neurônios

GABAérgicos e os receptores NMDA sendo inibidos pela Cetamina, estes processos plásticos ocorreriam de forma mais intensa¹.

Ainda que a inibição direta de receptores NMDA pareça ser o principal mecanismo de ação da Cetamina, Engin; Treit e Dickson (2009) apontam que a Cetamina também pode atuar nas mesmas regiões que fármacos com efeito ansiolítico. Os autores ainda discutem uma série de outros estudos que parecem corroborar que há a interação direta deste fármaco em outros receptores como os receptores opioides, GABA_A, serotoninérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) e em outras proteínas de membrana, como os canais iônicos de cálcio, sódio e potássio (Engin et al., 2009; Mion & Villeveille, 2013). O isômero S-Cetamina tem mostrado, de maneira geral, maior afinidade, tanto na ligação com receptores NMDA, como com os demais (Mion & Villeveille, 2013). Poleszak et al., (2011) neste caminho, indicam que a inibição de receptores NMDA intensificam a ação de antidepressivos serotoninérgicos enquanto não parecem influenciar antidepressivos dependentes de vias noradrenérgicas.

A Cetamina, neste contexto de interação com demais receptores, tem sido indicada com alta afinidade em receptores dopaminérgicos, em especial receptores D2 (Cardona-Acosta & Bolaños-Guzmán, 2023; Kokkinou et al., 2018; Lindfors et al., 1997; Tan et al., 2012). Um de seus efeitos observados tanto em aplicação única, como de forma crônica, é o aumento significativo da concentração de dopamina na região mesencefálica, o que têm sido indicados como também uma das possíveis vias pelas quais este fármaco exerce seu papel antidepressivo (Belujon & Grace, 2014; Cardona-Acosta & Bolaños-Guzmán, 2023). Em contextos de aplicação crônica deste fármaco foi observado que ele promove um processo de regulação

¹ Para informações mais detalhadas de argumentos que sustentam essas hipóteses e mecanismos neurofisiológicos descritos indico a leitura de Aleksandrova & Phillips (2021)

positiva da atividade de neurônios dopaminérgicos, produzindo adaptação dessas circuitarias, elevando o limiar basal da concentração de dopamina (Lindefors et al., 1997; Tan et al., 2012).

Quando analisado em estudos clínicos, o efeito da aplicação aguda da Cetamina pode ser observado tanto em casos de transtorno depressivo maior clássico (TDM), como em casos resistentes a tratamento (Berman et al., 2000; DiazGranados et al., 2010; Zarate et al., 2006) e na fase depressiva do transtorno bipolar (Diazgranados et al., 2010; Zarate et al., 2012). A Cetamina também exerce um rápido efeito na remissão de sintomas relacionados à ideação suicida (DiazGranados et al., 2010; Price et al., 2009). Dessa maneira, embora a Cetamina possua potencial de abuso e propriedades dissociativas (Cardona-Acosta & Bolaños-Guzmán, 2023; Zanos et al., 2016) pode ser um importante recurso para um tratamento farmacológico de efeito mais imediato, reduzindo assim a evasão ao tratamento.

Efeitos comportamentais da Cetamina em processos de reforço e modelos animais de depressão.

A Cetamina, além de outros inibidores de receptores NMDA, também tem se mostrado efetiva em procedimentos experimentais que utilizam testes de triagem como: Nado forçado (Autry et al., 2011; Engin et al., 2009; Li et al., 2010; Maeng et al., 2008; Popik et al., 2008; Viana et al., 2021; Zanos et al., 2015, 2016), teste de suspensão pela cauda (Koike et al., 2011; Popik et al., 2008; Viana et al., 2021; Zanos et al., 2015), inibição por pré-pulso (Zanos et al., 2015) e consumo de sacarose (Autry et al., 2011; Li et al., 2011; Papp et al., 2017). Nestes e em outros estudos também foi avaliada ação da Cetamina em diferentes modelos animais que procuram simular sintomas depressivos, tais como: desamparo aprendido (Autry et al., 2011; Koike et al., 2011; Li et al., 2010; Maeng et al., 2008; Zanos et al., 2015, 2016), estresse crônico moderado (Autry et al., 2011), estresse crônico imprevisível (Li et al., 2011), estresse crônico por derrota social e anedonia induzida por corticosterona (Zanos et al., 2016).

Ainda, naquilo que concerne a estudos experimentais sobre a ação da Cetamina, pode-se citar outros delineamentos que investigaram a possibilidade deste fármaco ter efeito ansiolítico, sendo utilizados procedimentos como labirinto em cruz elevado (Autry et al., 2011; Koike et al., 2011; Papp et al., 2017), alimentação suprimida pela novidade (Autry et al., 2011; Li et al., 2010, 2011; Zanos et al., 2015, 2016), atividade em campo aberto (Engin et al., 2009; Zanos et al., 2015), condicionamento de esquiwa passiva (Maeng et al., 2008), preferência condicionada de lugar (Zanos et al., 2015), além de outras medidas não comportamentais. Não foi observado consenso a presença ou não de um efeito ansiolítico a partir da aplicação aguda de Cetamina nestes trabalhos, portanto, havendo a necessidade de mais estudos nessa temática. Nos trabalhos experimentais, tanto avaliando o potencial como antidepressivo, quanto ansiolítico, observa-se uma ampla gama de dosagens de Cetamina, variando de 0,5 a 160 mg/kg. As dosagens mais frequentes variaram entre 0,5 e 10 mg/kg.

De maneira geral, os estudos em laboratório corroboram os achados referentes aos ensaios clínicos anteriormente citados (Berman et al., 2000; DiazGranados et al., 2010; Diazgranados et al., 2010; Papp et al., 2017; Price et al., 2009; Zarate et al., 2006, 2012). A única exceção encontrada foi o estudo de Popik et al., (2008). Em tal trabalho foi avaliado o efeito agudo e crônico da aplicação do fármaco em testes de nado forçado e suspensão pela cauda. Os principais resultados foram negativos para o efeito antidepressivo exceto na avaliação do efeito agudo da Cetamina (50 mg/kg) no teste de nado forçado, em que se observou uma diminuição do tempo de imobilidade dos animais. No entanto, um dos motivos que poderia ser apontado como responsável pelos resultados negativos é a utilização de dosagens altas de Cetamina (50 e 160mg/kg), não encontradas em outros estudos, sendo que os autores indicaram um efeito sedativo considerável da dosagem maior. Este dado é relevante por indicar que não é

observado efeito antidepressivo quando são aplicadas doses mais elevadas, tanto de maneira aguda, quanto crônica.

Diante do importante papel da Cetamina na remissão de sintomas depressivos e modulação positiva do processo de sinaptogênese em vias associativas (Duman et al., 2012; Li et al., 2010, 2011), é importante compreender o seu impacto em processos comportamentais, para além da remissão de sintomas associados ao transtorno depressivo, e/ou sua ação biomolecular. Autry et al., (2011) e Li et al., (2011) apresentam dados que permitem avaliar a influência do fármaco no consumo de uma solução de sacarose, uma forma básica de medição da sensibilidade do organismo a estímulos reforçadores.

Em animais submetidos ao protocolo de stress crônico moderado, é observado redução do consumo da solução de sacarose (Grønli et al., 2004; Papp et al., 1991; Strekalova et al., 2006; Strekalova & Steinbusch, 2010; Willner et al., 1987), os antidepressivos, neste contexto, têm efeito de reverter essa redução de consumo (Autry et al., 2011; Li et al., 2011; Strekalova et al., 2006; Willner et al., 1987). A Cetamina exerce um efeito semelhante ao de antidepressivos clássicos, revertendo a redução do consumo de sacarose por animais submetidos ao protocolo de estresse crônico (Cardona-Acosta & Bolaños-Guzmán, 2023; Kingir et al., 2023; Papp et al., 2017).

Mecanismos neurofisiológicos do reforço condicionado.

Em virtude da modulação de processos comportamentais através da ação farmacológica é necessário descrever e compreender a que estes processos se referem. Dentro da análise Experimental do comportamento (AEC), o conceito de reforço, em particular de reforço positivo, descreve os efeitos de aumento da probabilidade de determinada resposta após a adição de determinados estímulos, como, por exemplo, água, comida e interação social (Catania, 1999; Skinner, 1981). Estes estímulos recebem o nome de reforçadores

incondicionados devido à sensibilidade inata do organismo a seu efeito reforçador, determinadas pelo processo de seleção natural (Gonçalves & Silva, 1999). A ação e os efeitos de reforçadores sobre o comportamento têm sido estudados e divididos didaticamente sob os paradigmas operante e respondente (Baum, 2006; Catania, 1999). No entanto, tais paradigmas não acontecem de maneira isolada, mas de maneira integrada e sinérgica (B. F. Skinner, 1938).

Quando analisado sob o paradigma operante, o reforço tem como principal efeito o fortalecimento do responder, ou seja, sua ocorrência produz o aumento da probabilidade de que a respostas funcionalmente semelhantes que o precede, ocorram novamente em contextos semelhantes (B. F. Skinner, 1938). Reforçar uma resposta também produzirá efeitos na sua intensidade, latência e topografia (Baum, 2006; Catania, 1999), estando esses efeitos circunscritos ao contexto ambiental específico em que ocorreu a apresentação do reforço. Estímulos reforçadores, neste contexto, exercem o papel de selecionar respostas e assim produzir repertórios comportamentais diversos frente a ambientes em constante mudança (Catania, 1999; B. Skinner, 1981).

A presença de reforçadores incondicionados associados a contextos específicos pode ocasionar a transferência do efeito reforçador à estímulos neutros presentes neste contexto devido a associação entre esses estímulos. Este fenômeno é denominado condicionamento respondente e os estímulos neutros que passaram a exibir uma função reforçadora são denominados reforçadores condicionados ou secundários (Catania, 1999; Mazur, 2012; Tomanari, 2000). Cabe ressaltar que esta forma de aprendizagem ocorre de forma independente da apresentação de respostas operantes do organismo, no entanto não deve ser entendido como um processo passivo (Rescorla, 1988). O processo de condicionamento respondente, para além do simples pareamento (contiguidade) entre um reforçador incondicionado e um estímulo neutro, é um processo que decorre da discrepância entre o contexto de sinalização e ocorrência do reforçador. Nesta leitura, o estímulo neutro adquire a capacidade evocativa e eliciadora de

respostas operantes e respondentes em decorrência da história de reforçamento do organismo, de forma que tal estímulo seja relacionado com a apresentação de reforçador futuro a partir de elementos/propriedades do contexto ambiental em que ocorrem (Rescorla, 1988).

Dessa maneira, o processo de condicionamento respondente se mostra como processo complexo de aprendizagem em que as propriedades do estímulo, como por exemplo: dimensão física, intensidade e frequência de apresentação dos estímulos neutros, assim como de estímulos incondicionados (aqui se restringindo apenas à reforçadores), modularão os resultados do condicionamento. Para além disso, Rescorla (1988) também indica que essas associações entre estímulos podem se organizar de forma hierarquizada, multiplicando e complexificando as relações que podem ser estabelecidas (Kelleher & Gollub, 1962; Rescorla, 1988; Tomanari, 2000).

Skinner (1938) aponta que há a sobreposição destes processos (condicionamento respondente e operante) e que a própria contingência operante produz reforçadores condicionados devido ao próprio arranjo estímulo–resposta–consequência (Mazur, 2012). Nessa composição, o estímulo que sinaliza a disponibilidade de um evento reforçador, mediante a ocorrência de determinada resposta, passa a também adquirir funções reforçadoras (Kelleher & Gollub, 1962; Rescorla, 1988; Tomanari, 2000).

Os reforçadores condicionados têm um papel significativo na manutenção de diversas classes operantes, uma vez que a grande maioria dos eventos reforçadores que estão presentes no ambiente foram estabelecidos via condicionamento respondente (Tomanari, 2000). Além disso, estes estímulos têm papel importante na manutenção de comportamentos operantes que produzem reforçadores incondicionados em baixa frequência ou com atraso considerável (Shahan, 2010; Tomanari, 2000), como por exemplo, em situações de encadeamento de respostas (Kelleher & Gollub, 1962; Mazur, 2012).

Tomanari (2000) apresenta em sua revisão que reforçadores condicionados apenas podem ser considerados como tal se duas condições forem atendidas. A primeira é a presença

da associação entre estímulo neutro e outro reforçador (incondicionado ou condicionado) já estabelecido e a segunda é o seu efeito sobre o responder análogo ao exercido por reforçadores incondicionados. A formação desses reforçadores condicionados tem como consequência a complexificação dos processos comportamentais, uma vez que reforçadores condicionados podem estabelecer novos reforçadores condicionados (Kelleher & Gollub, 1962; B. F. Skinner, 1938). Outra característica deste processo que também contribui para essa complexificação é a possibilidade de que um mesmo estímulo apresente função discriminativa e reforçadora simultaneamente, possibilitando a produção de cadeias comportamentais extensas complexas (Skinner, 1938).

Os métodos comportamentais para o estudo de reforçadores condicionados são bastante variados compreendendo delineamentos experimentais que utilizam cadeias comportamentais, esquemas encadeados concorrentes e economia de fichas, sendo este último mais presente em estudos com humanos. Outro método muito comum para se avaliar o valor de um reforçador condicionado é utilizar contextos em que o reforçador primário, previamente associado a ele, está ausente (Rescorla, 1988; Tomanari, 2000). Neste tipo de delineamento, há a aprendizagem do reforçador condicionado em um primeiro momento e após esta etapa são analisados os seus efeitos sobre o responder dentro de uma contingência operante. Neste procedimento se avalia os efeitos do reforçador condicionado previamente estabelecido sobre o processo de aquisição/manutenção de novas respostas operantes (Ranaldi & Beninger, 1993). Os efeitos comportamentais produzidos por estes estímulos são analisados através das dimensões de frequência e magnitude das respostas, assim como a resistência do responder ao processo de extinção, na medida em que não há a ocorrência de reforçadores incondicionados neste segundo arranjo (Ranaldi & Beninger, 1993; Tomanari, 2000).

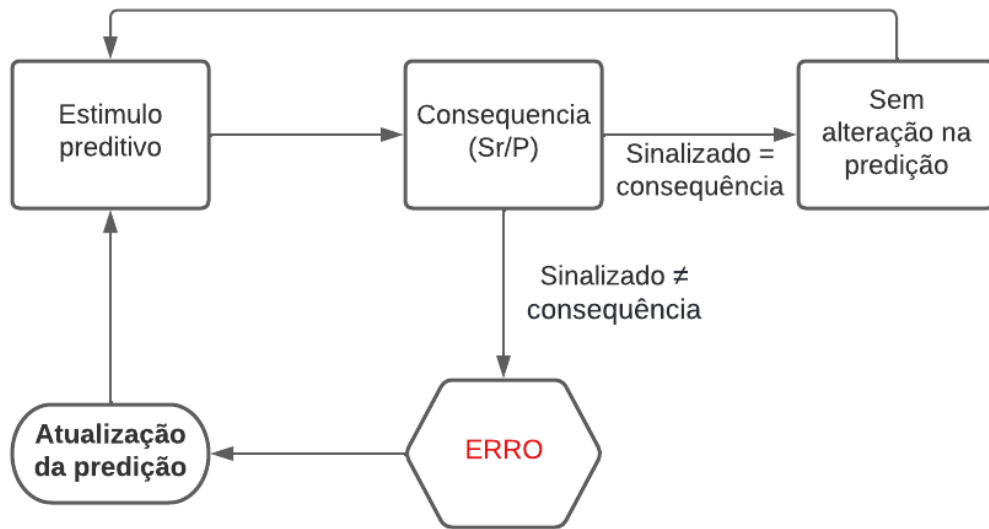
Entre os fatores que podem influenciar o quão eficientemente um estímulo reforçador condicionado seleciona as respostas que o precedem estão o número de pareamentos realizados,

a contiguidade temporal com a apresentação do reforçador incondicionado, a possível função discriminativa que este estímulo pode apresentar e o esquema utilizado no pareamento de estímulos (Tomanari, 2000). Um fator importante a ser evidenciado dentro deste último ponto é que esquemas intermitentes parecem se mostrar mais efetivos na manutenção da função reforçadora de estímulos condicionados do que um pareamento contínuo em contextos de extinção (Knott & Clayton, 1966; Lilliquist et al., 1999).

Estudos dentro da farmacologia e neurociências trouxeram contribuições para o entendimento mais completo dos processos comportamentais básicos, como os efeitos de reforçadores incondicionados e condicionados. Schultz (2015) em um artigo de revisão apresenta e discute evidências de vias neuronais específicas que são responsáveis pelo processamento de informações referentes a estímulos reforçadores. O autor indica que áreas da amígdala, córtex orbitofrontal, corpo estriado e neurônios dopaminérgicos na região mesencefálicas estão envolvidos não só no processamento da informação a respeito da presença/ausência de reforçadores, mas também decodificam informações relacionadas a outras propriedades dos reforçadores, como a sua intensidade e valor (Schultz, 2015; Schultz et al., 1993, 1997). Esta leitura se apoia principalmente na interpretação dos processos de aprendizagem a partir da teoria da previsão de erro (Figura 1) de Rescorla e Wagner, de maneira que os estímulos ambientais teriam a capacidade de sinalizar, com base em aprendizagens prévias, a ocorrência ou não de determinados eventos reforçadores futuros (Schultz, 2015; Schultz et al., 1997). Desse modo, processos de aprendizagem ocorrem na medida em que uma sinalização da ocorrência de determinado evento futuro (consequência sinalizada) é discrepante do que de fato ocorre (consequência reforçadora/punidora), o que é chamado de erro de predição.

Figura 1

Diagrama do aprendizado a partir da teoria de predição de erro



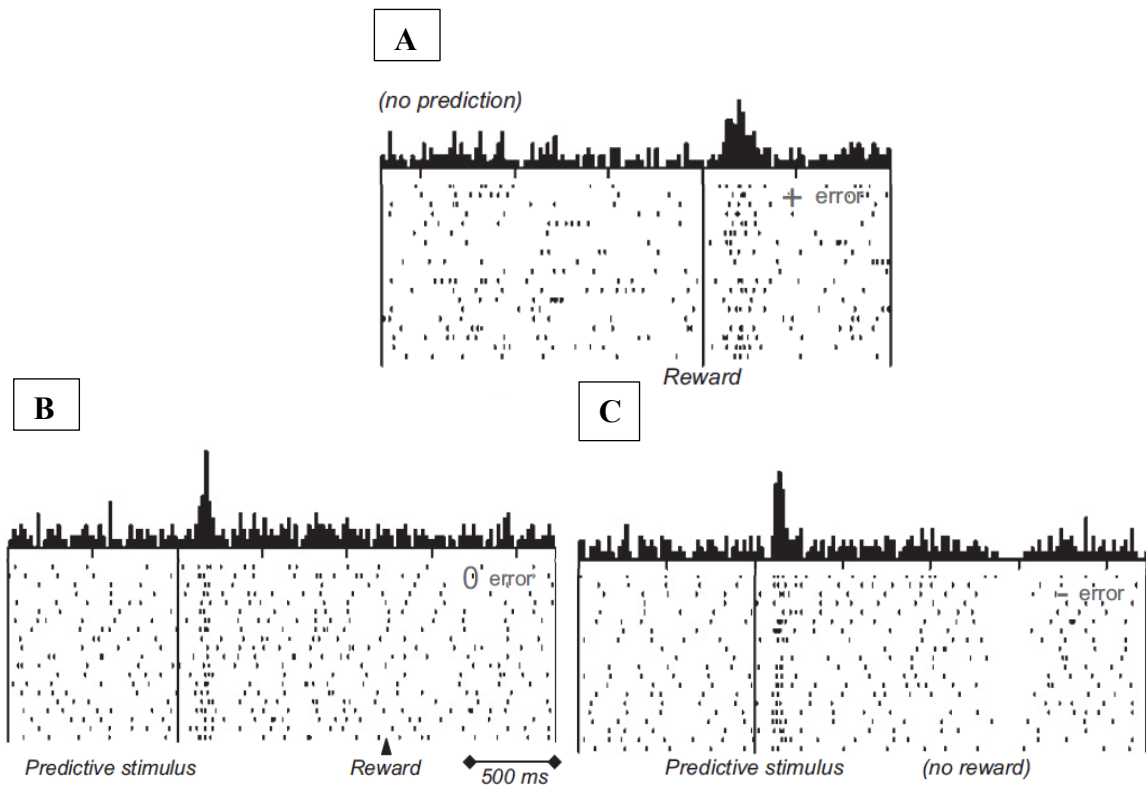
Legenda: Diagrama de predição de erro adaptado do modelo apresentado por Schultz (2015). Este diagrama apresenta o processo de aprendizagem da previsão de erro. Neste processo quando uma consequência é congruente ao previsto não há alteração naquilo que é sinalizado pelo estímulo (i.e não ocorre aprendizagem). Já quando a consequência prevista difere daquilo que foi previsto ocorre uma situação de erro ocasionando uma atualização da predição condizente com o erro ocorrido. Fonte: Autor, 2023. Adaptado de (Schultz, 2015).

Predições exatas não promoveriam aprendizagem segundo este modelo, uma vez que os estímulos ambientais sinalizam de forma correta a ocorrência futura de reforçadores/punidores. Já erros de predição, ou seja, a incongruência entre a consequência prevista e consequência obtida, produziriam respostas fisiológicas e comportamentais adaptativas, atualizando a função preditiva dos estímulos sinalizadores. Erros de predição positivos se referem a situações em que a consequência é maior/mais intensa do que a sinalizada e erros de predição negativos se referem à quando a consequência é menor/menos intensa do que a que foi sinalizada (Schultz, 2015). A ocorrência de erros dentro do paradigma operante resultaria em alterações comportamentais frente a função discriminativa do estímulo preditor e nas respostas que este ocasiona. Em processos respondentes o erro produz alterações nas respostas eliciadas por este estímulo e atualizará o valor preditivo deste estímulo quando apresentado no futuro.

Esta teoria entra em confluência com os achados de Schultz (2015) e demais autores citados em sua revisão, em relação à atividade de neurônios dopaminérgicos nas regiões mesenfálicas e suas respectivas projeções, sendo o núcleo accumbens (NAc) e a região ventral tegumentar (VTA) regiões importantes na decodificação e sinalização do reforço (Galaj & Ranaldi, 2021; Ranaldi et al., 2011; Schultz, 2015). Esta circuitaria responde à apresentação de reforçadores incondicionados e condicionados resultando no aumento de disparos de potenciais de ação, ou seja, há um aumento da atividade fásica desses neurônios (Ranaldi et al., 2011; Schultz et al., 1993). Schultz, Dayan e Montague (1997) apontam que se esses estímulos são de maneira consistente precedidos por um outro estímulo, a resposta deixa de seguir o reforçador incondicionado e passa a ser controlada pelo estímulo que o precede, como pode ser visto na Figura 2 (B) (Schultz, 2015; Schultz et al., 1997). Estes dados ilustram em dimensões neurofisiológicas aquilo que foi observado e descrito em termos comportamentais como condicionamento respondente. Realizando uma leitura unificada destes processos, tem-se que, no processo de condicionamento respondente, um estímulo neutro passa a exercer a função de ativar circuitarias anteriormente ativadas pelos reforçadores incondicionados, ou seja, passa a eliciar disparos nas circuitarias dopaminérgicas.

Figura 2

Atividade dopaminérgica associada a estímulos reforçadores.



Legenda: (A) Padrão da atividade dopaminérgica quando a ocorrência do reforço não é sinalizada (predição de erro positiva). (B) Padrão de atividade dopaminérgica quando há um estímulo que sinaliza a ocorrência do reforço, sendo uma situação em que a predição é congruente com o estímulo reforçador apresentado (não há previsão de erro). (C): padrão da atividade dopaminérgica quando a ocorrência do reforço é sinalizada, mas não ocorre (previsão de erro negativa). Fonte: Schultz (2015) referente a publicação prévia de Schultz; Dayan; Montague (1997).

Em uma situação de erro de predição negativo, quando há a apresentação do estímulo sinalizador e não ocorre a apresentação do estímulo reforçador, é observada a depressão da atividade fásica dos neurônios dopaminérgicos no momento em que o reforço sinalizado ocorreria (Figura 2C) (Schultz et al., 1997). Estes dados não só sintetizam o processo de condicionamento respondente, mas também corroboram a teoria de erro de previsão de Rescorla e Wagner (Schultz, 2015).

A intensidade e a duração do aumento da atividade destes neurônios também estão relacionadas ao valor reforçador destes estímulos. Outro fator interessante é que a atividade destas circuitarias também tem se mostrado sensível ao atraso em relação à apresentação do estímulo reforçador (Schultz et al., 1993). Estímulos sinalizadores que estão mais distantes temporalmente de reforçadores incondicionados eliciam uma mudança da atividade fásica menos intensa e/ou de menor duração, quando comparados a sinalizadores mais próximos. A desvalorização de reforçadores condicionados pelo atraso já foi previamente descrita por Skinner (1938). Embora estes estudos descrevam o padrão de ativação dos neurônios dopaminérgicos de maneira pormenorizada, ainda falta responder como que os estímulos ambientais neutros passam a produzir ativação desta circuitaria dopaminérgica. Galaj; Ranaldi (2021) abordaram tal questão.

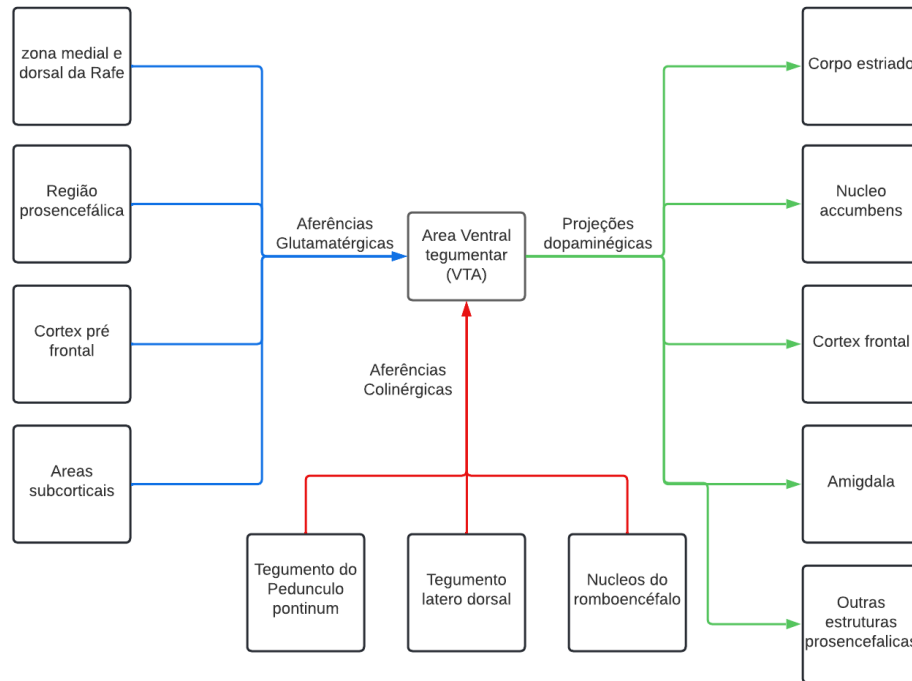
Os autores discutem evidências de que estímulos neutros e reforçadores incondicionados ativam circuitarias distintas até chegarem no eixo VTA-NAc e o processo de condicionamento seria o resultado da ativação conjunta de ambas as vias neuronais em regiões específicas do sistema nervoso (Galaj & Ranaldi, 2021). Essa atividade conjunta produziria, por sua vez, alterações na responsividade de neurônios pós-sinápticos que integram estas duas vias. Essa visão consiste numa perspectiva de aprendizado associativo baseada na proposta hebbiana de aprendizagem, em que as atividades sinápticas conjuntas produzem alterações nos neurônios pós-sinápticos, modulando assim a força dessa comunicação (Galaj & Ranaldi, 2021). Atualmente temos vários exemplos da ocorrência deste fenômeno em diversos processos plásticos no sistema nervoso, como potenciação de longa duração (LTP), depressão de longa duração (LTD), plasticidade dependente do tempo de picos (STDP) (Butts & Kanold, 2010; Kandel et al., 2014) até a modulação exercida por neuro-hormônios tanto em processos de sinaptogênese ou de degeneração sináptica (Garcia-Segura, 2009). O processo de STDP tem sido observado como um dos produtos da ação conjunta de neurônios na modulação da

frequência de disparo em neurônios pós-sinápticos (Butts & Kanold, 2010; Yagishita et al., 2014), corroborando com o modelo Hebbiano de aprendizagem.

Galaj e Ranaldi (2021) indicam que a região do VTA parece ser uma região-chave na qual estes processos plásticos ocorreriam. Os neurônios dopaminérgicos da região do VTA têm projeções para regiões como o núcleo accumbens, principal estrutura envolvida no processamento de informações relacionadas ao reforço, e demais regiões mesencefálicas. O disparo dessas vias ocorre principalmente em resultado da estimulação provinda de neurônios colinérgicos e glutamatérgicos (Galaj & Ranaldi, 2021; Schultz, 2015). Neurônios colinérgicos, nesse sentido, têm sido indicados como críticos na sinalização de reforçadores incondicionados e receptores muscarínicos tem se mostrado como principais responsáveis pela ativação nos neurônios dopaminérgicos na região do VTA. Em contrapartida, a sinalização glutamatérgica nos neurônios dopaminérgicos dessa região parece exercer um papel fraco no processo de despolarização de membrana destes neurônios, tornando a conversão dessa sinalização em potenciais de ação em neurônios DA menos provável. Antagonistas de receptores muscarínicos provocam a diminuição de disparos de neurônios DA no NAc, por conseguinte, agonistas tem o efeito de intensificar a atividade neuronal nesta região (Rada et al., 2000).

Figura 2

Esquema da comunicação glutamatérgica e colinérgica na região do VTA.



Legenda: Principais regiões neuronais de aferências glutamatérgicas (em azul), para informações mais pormenorizadas das estruturas envolvidas consultar (Geisler et al., 2007), Colinérgicas (em vermelho) (Garzo'n et al., 1999; Steidl et al., 2017) e principais regiões para onde há projeções de neurônios dopaminérgicos a partir da área ventral tegumentar (VTA), para mais informações sobre a circuitaria dopaminérgica consultar (Schultz, 2015). Fonte: Autor.

Neurônios dopaminérgicos têm sido indicados como vias importantes no processamento de estímulos ambientais e têm se mostrado sensíveis a apresentação de estímulos novos ou intensos, resultando na produção de potenciais de ação nos neurônios dopaminérgicos na região tegumentar ventral (Galaj & Ranaldi, 2021). A região do VTA neste sentido, tem sido indicada como uma estrutura de integração importante e processamento destas aferências glutamatérgicas distribuídas nas mais diferentes regiões do sistema nervoso central (Figura 3). No entanto, frente a estímulos ambientais menos intensos e inesperados, a sua atividade tem se mostrado menos intensa, não acionando a circuitaria dopaminérgica (Galaj & Ranaldi, 2021).

A proposta de Galaj e Ranaldi (2021) sobre como ocorreria a aprendizagem de reforçadores condicionados consiste em uma abordagem relacional entre a atividade de neurônios colinérgicos e glutamatérgicos no VTA. Durante o processo de condicionamento há sinalização conjunta de neurônios colinérgicos (sinalizando presença de reforçadores incondicionados) com neurônios glutamatérgicos associados a outros estímulos ambientais relacionados ao reforço. Neste contexto, a estimulação promovida pela aferência glutamatérgica não produz o efeito de ativação de potenciais de ação nos neurônios pós-sinápticos (estimulação abaixo do limiar de potencial de ação). A ação dos receptores muscarínicos, nesse momento, produz uma despolarização de membrana suficiente para retirar o magnésio alocado no canal dos receptores NMDA (NMDAr), receptor ionotrópico dependente de voltagem. Este processo produz um influxo de cálcio nos neurônios DA, ativando a ação da calmodulina kinase II (CaMKII), o que leva a ocorrência de processos plásticos que resultarão no aumento da expressão de receptores AMPAr. Como resultado deste processo há o aumento da sensibilidade do neurônio pós-sináptico ao glutamato aumentando as respostas nas células DA do VTA, quando estimuladas (Galaj & Ranaldi, 2021).

Este processo se assemelha com processos de LTP e/ou STDP, tendo em vista o papel chave que os NMDArs têm no desencadeamento de processos plásticos em neurônios pós-sinápticos (Kandel et al., 2014). O bloqueio desses receptores tem sido apontado como tendo efeitos inibitórios ou até deletérios no momento de formação de reforçadores condicionados (Fitzpatrick & Morrow, 2017; Galaj & Ranaldi, 2021; Ranaldi et al., 2011), no entanto, a delimitação de seu papel exclusivamente na fase de aprendizagem de reforçadores condicionados deve ser vista com cautela. Embora haja trabalhos que apontem a exclusividade de sua importância no início do condicionamento, Wickham et al. (2015) apontam que o bloqueio agudo de receptores NMDA, na área do VTA, também reduzem o valor de reforçadores condicionados previamente estabelecidos.

Estes dados indicam um importante papel dos receptores NMDA neste processo. No entanto, também indicam a necessidade de mais estudos para uma caracterização mais exata do papel destes receptores no estabelecimento de reforçadores condicionados. A sua presença em regiões do corpo estriado (Yagishita et al., 2014) também parece exercer papel importante sobre processos de STDP (Butts & Kanold, 2010). Este processo plástico tem sido observado como um dos produtos da ação conjunta de neurônios na modulação da frequência de disparo em neurônios pós-sinápticos (Butts & Kanold, 2010; Yagishita et al., 2014). Tal processo poderia se aplicar ao modelo proposto por Galaj e Ranaldi (2021) na aquisição de reforçadores condicionados, no entanto, são necessários mais estudos para sustentar esta suposição.

Cetamina como possível moduladora de reforçadores condicionados.

A compreensão do papel dos receptores NMDA no processo de reforço condicionado, não apenas auxilia na descrição dos mecanismos neurofisiológicos, mas também permite a descoberta de fármacos que modulem este processo, contribuindo para o tratamento de diversas patologias. Como discutido brevemente no subcapítulo 1.2 um dos principais modelos experimentais que mimetizam aspectos sintomatologia do transtorno depressivo são os protocolos de estresse crônico moderado, do inglês chronic mild stress (CSM) (Grønli et al., 2004; Strekalova et al., 2006; Strekalova & Steinbusch, 2010; Willner, 1997, 2005).

Neste modelo, são utilizados estressores de média intensidade randomizados na sua duração e frequência de modo a se criar um quadro comportamental e neurofisiológico semelhante ao encontrado em ensaios clínicos humanos (Willner et al., 1992). A sua validade enquanto modelo tem sido sustentada pela combinação de validade preditiva, face e de constructo (Papp et al., 2017; Willner, 1997, 2005; Willner et al., 1992). Isto, pois, intervenções farmacológicas utilizando antidepressivos produzem a remissão das alterações

comportamentais e neurofisiológicas promovidas pela aplicação deste protocolo (Validade preditiva) (Kingir et al., 2023; Li et al., 2011; Papp et al., 2017; Strekalova et al., 2006; Willner et al., 1987). Associado a este efeito, também se observam alterações comportamentais que se aproximam da descrição de comportamentos de quadros depressivos clássicos, sendo transpostos para o contexto Experimental como redução do consumo de soluções adocicadas (reforçadores incondicionados), redução da preferência condicionada de lugar associado às soluções adocicadas (i.e reforçadores condicionados) e redução de comportamento sexual. Também pode ser observado uma redução de comportamentos agressivos, alterações no ciclo de sono e de memória (Willner, 1997, 2005; Willner et al., 2013).

A ocorrência da redução do consumo da solução de sacarose, preferência por soluções açucaradas, comportamento sexual, bem como a diminuição da preferência condicionada de lugar, pode ser considerado como análogos à redução de interesse e/ou prazer por atividades e eventos que anteriormente exerciam função reforçadora na vida do sujeito evidenciando sua validade de constructo (Ferster, 1973; Willner, 2005; Willner et al., 2013). Desse modo, o transtorno depressivo maior, enquanto uma categoria nosológica, parece estar associada a um processo de redução da sensibilidade a estímulos reforçadores incondicionados e condicionados presentes no ambiente (Costello, 1972; Ferster, 1973; Gonçalves, 2000; Willner et al., 2013). Portanto, um dos papéis do tratamento farmacológico seria regular esta sensibilidade a níveis não patológicos, para além de produzir remissão dos demais sintomas associados a este transtorno (Willner et al., 2013).

Uma vez que a Cetamina provoca a inibição de receptores NMDA e sua ação antidepressiva parece depender da atividade dos receptores AMPA, assim como pela intensificação da atividade glutamatérgica de longo prazo, sugere-se uma grande proximidade entre os processos neuronais relacionados à aprendizagem do reforço condicionado com as

principais vias de ação deste fármaco (Fitzpatrick & Morrow, 2017; Galaj & Ranaldi, 2021; Wickham et al., 2015). Ranaldi et al. (2011), e posteriormente Galaj e Ranaldi (2021), sugerem que a aprendizagem do reforço condicionado seria prejudicada ou até impossibilitada pela inibição aguda de receptores NMDA pelo seu papel crítico no aumento de expressão de receptores AMPA nos neurônios dopaminérgicos.

Nesse sentido, indicam que a estimulação dos receptores NMDA seria necessária para o estabelecimento do estímulo reforçador condicionado, enquanto deixa de ser importante no momento que o condicionamento já está estabelecido (Fitzpatrick & Morrow, 2017; Galaj & Ranaldi, 2021; Ranaldi et al., 2011). Por outro lado, Wickham et al. (2015) indicam que o bloqueio de receptores NMDA, por meio da aplicação intracraniana de AP-5, um inibidor de receptores NMDA na área ventral tegumentar, reduzem o valor reforçador de estímulos condicionados previamente aprendidos, indicando que de alguma forma estes receptores ainda mantêm sua importância nesse processo.

Dos estudos realizados acerca dos efeitos comportamentais do bloqueio do NMDAr, apenas Fitzpatrick e Morrow (2017) utilizaram a Cetamina. Nos demais estudos, o fármaco utilizado foi o AP-5, aplicado em via intracraniana (Ranaldi et al., 2011; Wickham et al., 2015). Enquanto Ranaldi et al. (2011) e Wickham et al. (2015) procuraram analisar a inibição de receptores NMDA especificamente na região do VTA, Fitzpatrick & Morrow (2017) avaliaram o uso da Cetamina na modulação do Controle exercido por dicas ambientais associadas a reforçadores incondicionados assim como seu efeito sobre reforçadores condicionados previamente aprendidos. Embora seus resultados tenham indicado que o efeito agudo da Cetamina não parece modular o valor de reforçadores condicionados já aprendidos, seus dados apontam que este fármaco diminui a intensidade do Controle exercido pelo estímulo associado a reforçadores primários em respostas de aproximação.

Nesse sentido, o estudo do efeito da Cetamina, em doses menores que 32 mg/kg (Fitzpatrick & Morrow, 2017), sobre reforçadores condicionados pode contribuir para compreensão dos efeitos antidepressivos dessa substância, uma vez que um dos seus efeitos parece ser o de modular a eficácia de estímulos reforçadores. Por outro lado, também contribui para avaliação do efeito da aplicação sistêmica de Cetamina sobre este processo, dado que apenas Ranaldi et. al. (2011) avaliou o efeito do bloqueio de receptores NMDA em regiões específicas do sistema nervoso central sobre o processo de condicionamento respondente.

De maneira a elucidar uma aparente lacuna na literatura sobre o efeito que a Cetamina, em dosagens comuns às utilizadas em delineamentos de modelos animais de depressão, exerce sobre a aprendizagem e manutenção da saliência de reforçadores condicionados é proposto o delineamento Experimental descrito na próxima seção dessa dissertação (Capítulo 2). Com este delineamento foi avaliado os efeitos comportamentais tardios provocados pela Cetamina e, também, o seu efeito agudo no bloqueio dos receptores NMDA, sobre o processo de condicionamento e manutenção da sua eficácia após aprendizagem.

Em consonância ao apresentado por Galaj e Ranaldi (2021) é esperado que a Cetamina dificulte o processo de aquisição de reforçadores condicionados quando aplicada logo antes das sessões de condicionamento. Em contrapartida ela não alteraria o desempenho dos animais quando aplicada logo antes das sessões de teste de reforçadores condicionados já estabelecidos. Quando aplicada com maior antecedência antes do processo de condicionamento, foi levantada a hipótese de que ela facilite o processo de condicionamento devido a sua ação sinaptogênica a longo prazo. Uma hipótese secundária seria um possível efeito do aumento da eficácia reforçadora do estímulo que sequer fora pareado com o reforçador incondicionado utilizado no delineamento adotado, de modo que possa haver um aumento da frequência de respostas de forma generalizada. Por fim, espera-se que os efeitos tardios da aplicação da Cetamina após o

processo de condicionamento sejam aumentar a eficácia de reforçadores previamente aprendidos, devido a intensificação da sinalização glutamatérgica de longo prazo, de acordo com o discutido previamente neste capítulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Foram utilizados ao todo 80 ratos machos de linhagem Wistar com idade aproximada de 60 dias. Antes do início do procedimento Experimental, os animais foram alocados em caixas coletivas, com 3 a 4 animais, com acesso a comida e água *ad libitum*. Para o início do procedimento os animais foram submetidos a um regime de restrição alimentar até atingirem 85% do peso *ad libitum*. O regime de restrição alimentar consistiu na disponibilização de alimento por um período de 30 a 40 minutos diários, até que o peso de 85% *ad libitum* fosse atingido. Este tempo foi ajustado após a primeira sessão do procedimento para 1 hora por dia após cada sessão Experimental. Caso os animais apresentassem redução do peso após o início do experimento este tempo era aumentado em 10 minutos por dia até que fosse observado ganho de peso e, após isso, novamente reduzido para 1 hora. Os ciclos de luz/escuro foram controlados (luz das 7 às 19 horas e escuro das 19 às 7 horas), sendo mantidos sob temperatura de 22°C com variação aproximada de 2°C. Tanto o delineamento Experimental como protocolo de intervenção farmacológica foram submetidos a CEUA responsável e estão de acordo com as normas do CONCEA “Nº 1045/2021 Vol. 1”.

Materiais

Foram utilizadas 6 caixas de condicionamento operante Lafayette modelo 80004 (Lafayette Instruments, Lafayette) equipadas com uma houselight e duas barras (modelo 80110M) em uma das laterais da caixa em alumínio. Nessa mesma lateral havia uma luz de

estímulo acima de cada barra e na parte inferior, entre as barras, havia o orifício do comedouro (modelo 80210M-R). As caixas também eram equipadas com uma campainha do tipo sonalert. O espaço interno da caixa possui dimensões de 30,48x26,03x20cm (Largura x Comprimento x Altura). Os dados referentes ao desempenho dos animais no procedimento foram coletados pelo software ABET II (Lafayette Instruments, Lafayette) em um computador tipo PC.

Administração farmacológica

Foi aplicado nos animais dos grupos experimentais nos experimentos de 1 a 4, a Cetamina racêmica na dosagem de 10 mg/kg no volume de 1 ml/kg via intraperitoneal. Os fármacos utilizados nos experimentos 1 e 2 foi Dopalen® (ceva) e nos experimentos 3 e 4 Cetamin® (sintec). Em contraposição foi aplicado veículo salino estéril, em mesmo volume, em cada grupo Controle. Os Detalhes do momento de aplicação dos compostos foram descritos na seção de Procedimento, a seguir.

Procedimento

O procedimento de reforço condicionado seguiu o modelo de Ranaldi e Beninger (1993), que possui três fases distintas: Linha de base, condicionamento e teste. Estas três fases compreendem um período total de 11 dias, sendo as sessões realizadas diariamente. Na etapa de linha de base, ambas as barras estavam presentes e ativadas, uma produzindo como consequência um som de uma campainha do tipo sonalert (TONE) por 3 segundos e a outra barra o desligamento das luzes de estímulo (LO) pelo mesmo período. Em metade das caixas o estímulo LO foi acionado pela barra da esquerda e outra metade na direita, para assim excluir possíveis preferências por posição. Esta fase ocorreu por 5 dias corridos com sessões de 40 minutos, a distribuição de respostas entre as barras foi mensurada. Os animais foram colocados

na fase de linha de base ingênuos, ou seja, esta foi a primeira experiência deles na caixa de condicionamento operante.

Na etapa de condicionamento, imediatamente após a linha de base, as barras foram retiradas e houve o pareamento entre o estímulo LO com a apresentação de pellets (Bio-Serv, fórmula F0021) de comida por 4 sessões de 60 minutos. Foram apresentadas, na primeira sessão, um total de 80 estímulos LO seguidos da apresentação dos pellets em tempo variável (VT) de 45 segundos com amplitude de 5-90 segundos. Dessa maneira o pareamento entre LO e apresentação do pellet ocorreu em 100% das apresentações de LO. A partir da segunda sessão até a quarta foi disponibilizado o reforço em apenas 33% das apresentações do estímulo LO. Este recurso é utilizado como um reforço intermitente e, portanto, tem como objetivo o fortalecimento da relação entre LO e o reforçador incondicionado, assim como aumentar a resistência dessa relação ao processo de extinção (Knott & Clayton, 1966; Lilliquist et al., 1999).

Por fim, foram conduzidas duas sessões teste de 40 minutos. Nestas sessões foram colocadas as barras novamente, semelhante à linha de base, de modo que uma barra produz TONE por 3 segundos e a outra LO, também por 3 segundos, sem a apresentação dos pellets. A configuração do procedimento para cada experimento apenas se diferenciou pelo momento de aplicação da Cetamina. A Tabela 1, abaixo, apresenta os momentos de aplicação dos fármacos para cada experimento.

Tabela 1*Momento de aplicação da Cetamina em cada um dos 4 experimentos*

Experimento	Grupo	Linha de base	condicionamento	Teste	Fármaco	
1	Experimental (n=10)	-	Cetamina 30 min antes de cada sessão	-	Dopalen®	
	Controle (n=10)	-	Solução salina 30 min antes de cada sessão	-		
2	Experimental (n=10)	-	-	Cetamina 30 min antes de cada sessão		
	Controle (n=10)	-	-	Solução salina 30 min antes de cada sessão		
3	Experimental (n=10)	-	Cetamina 24 horas antes do início do condicionamento (Dose única)	-		Cetamin®
	Controle (n=10)	-	Solução salina 24 horas antes do início do condicionamento (Dose única)	-		
4	Experimental (n=10)	-	-	Cetamina 24 horas antes do início do teste (Dose única)		
	Controle (n=10)	-	-	Solução salina 24 horas antes do início do teste (Dose única)		

Legenda: “-“Indica a não ocorrência de aplicação, seja do fármaco, seja de veículo salino.

A Tabela 1 apresenta de forma esquemática a aplicação da Cetamina ou solução salina para cada um dos quatro experimentos propostos. No experimento 1, os fármacos foram aplicados 30 minutos antes de cada uma das 4 sessões de condicionamento. Este experimento teve como objetivo específico avaliar o efeito imediato da Cetamina sobre o processo de condicionamento. No experimento 2, a Cetamina foi aplicada 30 minutos antes de cada uma das duas sessões de teste, tendo como objetivo avaliar o efeito imediato do fármaco sobre reforçadores condicionados previamente aprendidos.

Já para os experimentos 3 e 4, os fármacos foram aplicados em dose única 24 horas antes do início da etapa de condicionamento (experimento 3) e de teste (experimento 4), respectivamente. No experimento 3, foi avaliada a hipótese de que os efeitos tardios da aplicação de Cetamina influencie positivamente a aprendizagem de novos reforçadores condicionados, facilitando este processo. No experimento 4, foi testada a modulação que este fármaco pode exercer sobre reforçadores previamente aprendidos. A execução dos experimentos ocorra de forma concomitante para os experimentos 1 e 2 e depois 3 e 4, de forma que a análise dos dados referente a todos eles foram realizados após a completa execução de todos os quatro experimentos. Adicionalmente estes experimentos nos permitiram avaliar se há um efeito generalizado sobre a formação de reforçadores condicionados. Esta análise foi possibilitada pela comparação do índice de eficácia reforçadora (Ranaldi & Beninger, 1993), tanto para o estímulo Tone como para LO, expresso pela seguinte equação:

$$i = \sqrt{\frac{\text{média teste} + 1}{\text{média LB} + 1}}$$

O índice descreve a relação da raiz quadrada da razão entre a média da frequência de resposta de pressão a barra (Lo ou Tone) na etapa de teste e na linha de base. Dessa maneira, quando o índice é inferior a 1, lê-se uma redução das respostas de pressão a barra na etapa de teste e em contra partida, se superior a 1 observa-se o aumento.

Análise estatística.

Para eliminação de outliers, foi realizada a análise de dispersão dos dados por meio do boxplot modelo de Tukey. A distribuição da frequência de respostas entre as barras durante a linha de base e o teste foi compilada a partir do índice de eficácia. O índice de eficácia foi comparado individualmente em cada experimento e analisado por meio da análise de variância

(ANOVA) de duas vias e a análise *post hoc* utilizada foi o teste de comparações múltiplas de Sidak. Os fatores principais utilizados pela ANOVA de duas vias foram: Barra (LO e Tone) e Tratamento (grupo Experimental ou salino). A análise planejada de comparações múltiplas de Sidak foi realizada em referência ao fator barra para cada grupo individualmente, de modo a evidenciar a ocorrência do processo de condicionamento.

RESULTADOS.

Como descrito anteriormente, os dados de cada experimento foram analisados de forma isolada, não havendo análise estatística que correlacionem experimentos distintos. Em vista a maior assertividade, os dados foram analisados a partir do índice de eficácia individualizado e coletivo por experimento, de modo a reduzir a quantidades de variáveis independentes dentro do tratamento estatístico. Tal decisão garante maior confiabilidade nas análises realizadas.

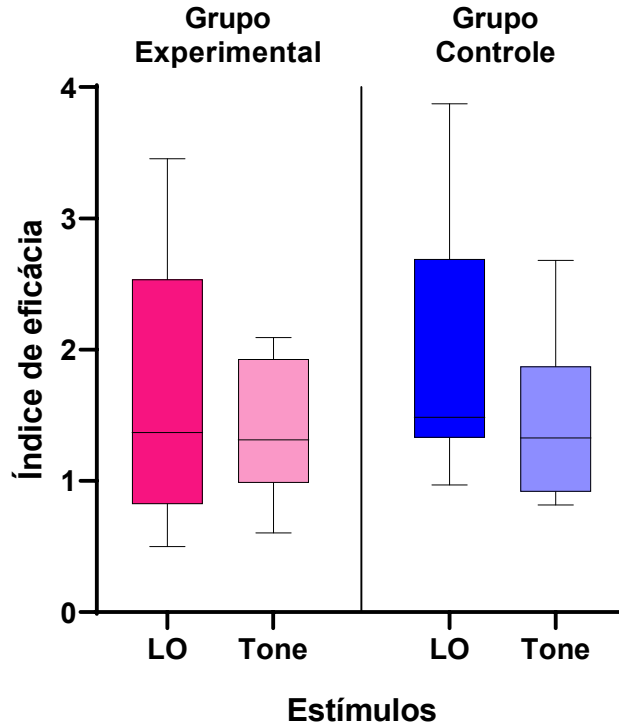
A aprendizagem do reforçador condicionado LO é descrita pelo aumento da frequência de respostas na barra que produz como consequência a apresentação do LO em detrimento da barra Tone comparando as etapas de linha de base (LB) e teste. Ou seja, a partir da fórmula do índice de eficácia, um processo de condicionamento bem sucedido seria representado por um índice > 1 para o estímulo LO e ≤ 1 para o estímulo Tone. Neste trabalho, tal desempenho grupal ou individual foi considerado como um condicionamento ideal. Um condicionamento considerado intermediário quando observado o aumento da frequência de respostas para LO e, simultaneamente, um aumento em menor intensidade em Tone (índice de LO $>$ Tone). Consideramos a não ocorrência de condicionamento quando não houve diferenciação entre os índices de Tone e LO (índice de LO = Tone), quando houve índices superiores a 1 de forma específica em Tone (índice de LO $<$ Tone), ou índice inferior a 1 para ambos os estímulos.

Experimento 1

O Experimento 1 teve como objetivo avaliar o efeito agudo e imediato da Cetamina sobre o processo de condicionamento. Para este fim, foi utilizado um procedimento de condicionamento faseado em 3 etapas: linha de base, condicionamento e teste. A primeira etapa consistiu em 5 sessões de 40 minutos na presença das barras LO e Tone. Na segunda etapa, de condicionamento, foram 4 sessões de 60 minutos em que as barras de LO e Tone haviam sido removidas e ocorreu o pareamento entre o estímulo LO e o pallet de comida. A terceira etapa, de teste, foram 2 sessões de 40 minutos em que as barras de LO e Tone foram colocadas novamente e ocorreram em esquema de extinção. A Cetamina e veículo salino (10 mg/kg no volume de 1 ml/kg e 1ml/kg, respectivamente) foram aplicados 30 minutos antes das 4 sessões experimentais na etapa de condicionamento. Foi testado neste experimento a hipótese de que a Cetamina teria um papel deletério no processo de condicionamento de reforçadores condicionados (Galaj; Ranaldi, 2021).

Figura 3

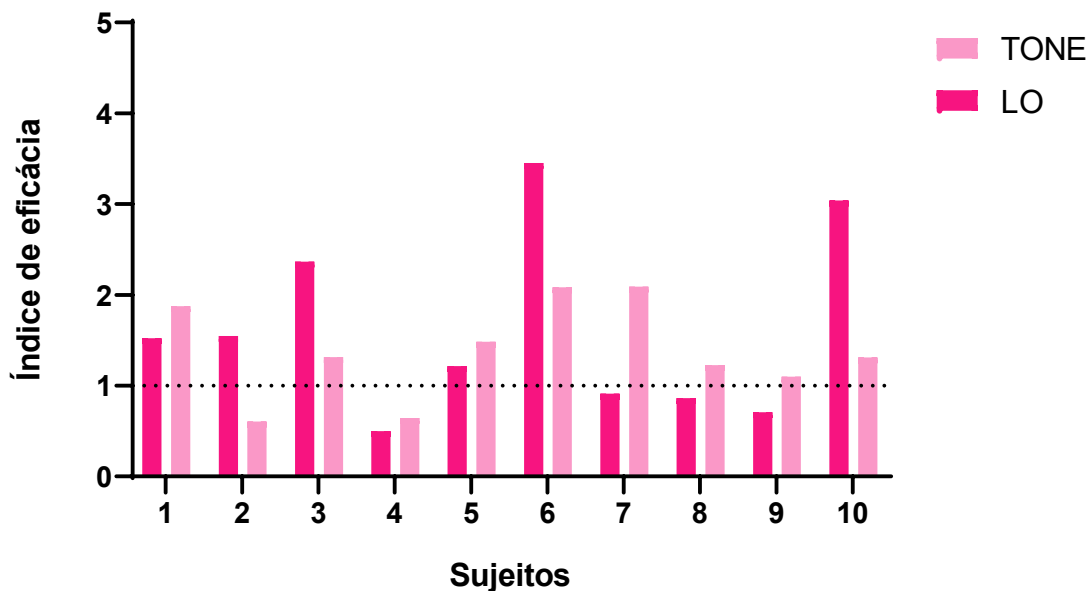
Experimento 1 - Bloxplot de Tukey – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



A análise da dispersão do índice de eficácia por meio do gráfico de tipo *boxplot* de Tukey (Figura 4) indicou a inexistência de outliers para ambos os grupos (Experimental e Controle). É observado que em ambos os grupos a maioria dos sujeitos apresentou índice de eficácia superior a 1 para as duas barras. De modo geral, observa-se menor dispersão do índice de eficácia para o estímulo Tone em comparação ao estímulo LO.

Figura 5

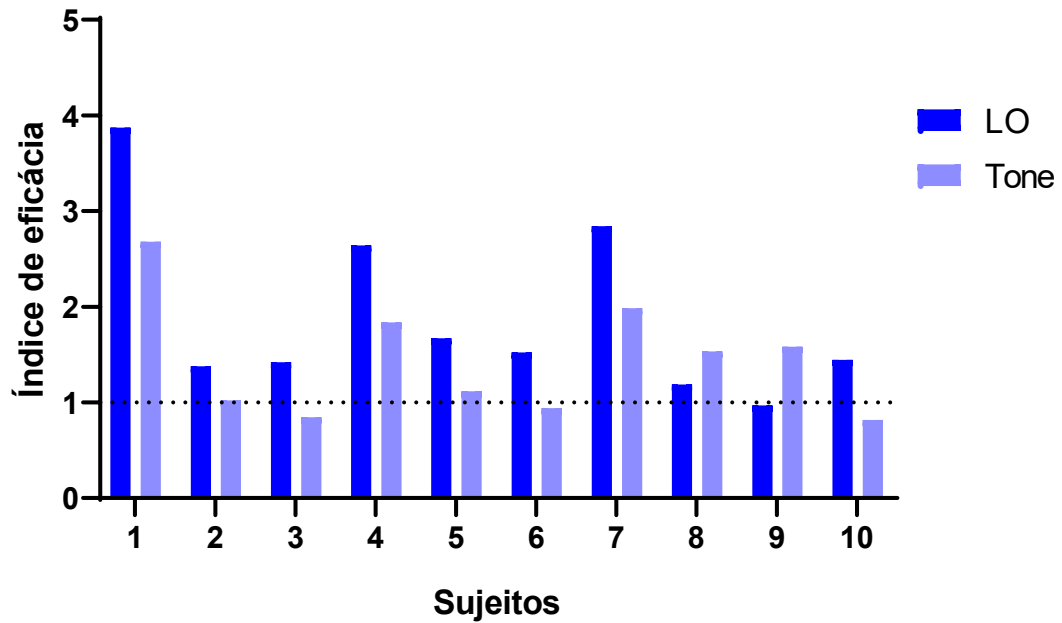
Experimento 1 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Experimental.



Na maior parte dos casos foi observado menor dispersão dos dados referentes ao estímulo Tone do que LO. Como não foram encontrados outliers neste experimento, a análise dos dados prosseguiu para a representação do desempenho individualizado dos animais para cada grupo. Foi observado que apenas os sujeitos 2, 3, 6, 10 do grupo Experimental (Figura 5) apresentaram evidências da ocorrência do processo de condicionamento para o estímulo LO. Os sujeitos 1, 5, 7, 8 e 9 apresentaram aumento específico das respostas na barra de estímulo Tone na etapa de teste, enquanto que o sujeito 4 deste grupo apresentou uma redução das taxas de respostas de forma inespecífica entre tais estímulos. Estes 6 sujeitos não apresentaram evidências do processo de condicionamento.

Figura 6

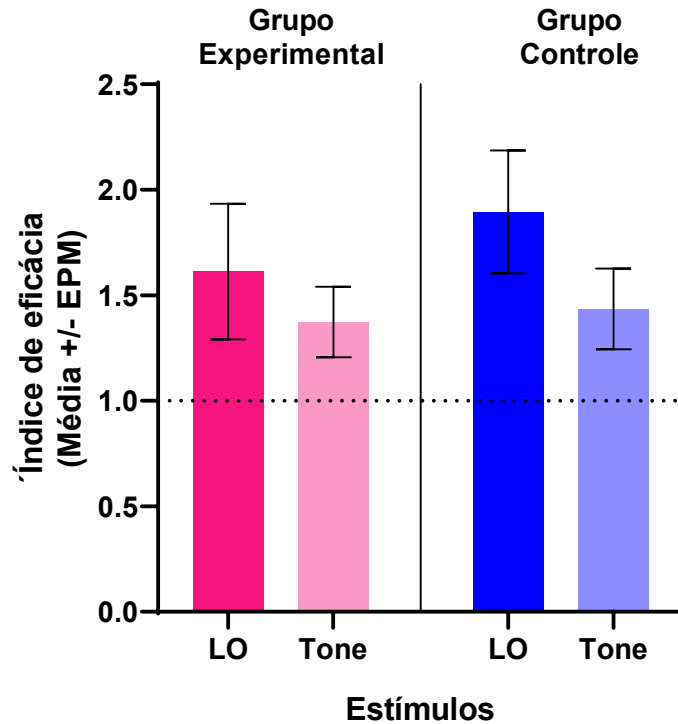
Experimento 1 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Controle.



Já no grupo Controle (Figura 6) foi observado nos sujeitos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 10 a formação do reforçador condicionado para o estímulo LO. Os sujeitos 8 e 9 apresentaram índice de eficácia superior a 1 de forma específica para Tone, indicando que não foram condicionados. Neste grupo, diferente do Experimental, não houve sujeitos que apresentaram responder indiferenciado, equivalente tanto para LO como para Tone, ou redução da taxa de resposta na etapa de teste em comparação com a linha de base para o estímulo LO.

Figura 7

Experimento 1 – Índice médio de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



A análise de variância (ANOVA) de duas vias do índice de eficácia referente aos estímulos LO e Tone (Figura7), para o grupo Experimental e Controle, não indicou efeito significativo entre os grupos no fator principal de tratamento [$F(1, 18) = 0,3101, P = 0,5845$], mas indicou um efeito marginalmente significativo para o fator principal de Barra [$F(1, 18) = 4,030, P = 0,0599$]. Não foi observada a interação entre estes fatores [$F(1, 18) = 0,3997, P = 0,5352$]. A análise por meio do teste de comparações múltiplas de Sidak também não indicou interações estatisticamente significativas, seja para o grupo Experimental ($P = 0,5692$), seja para o grupo Controle ($P = 0,1505$).

Discussão experimento 1.

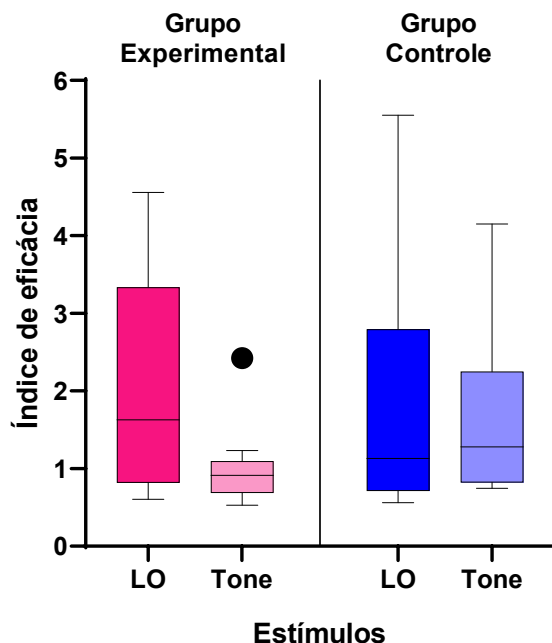
O conjunto dos dados referente ao desempenho de ambos os grupos a partir da ANOVA de duas vias indicou um efeito marginalmente significativo no fator principal de barra [F (1, 18) = 4,030 P = 0,0599]. Os animais, de forma geral, sofreram um efeito sutil do procedimento de condicionamento realizado no experimento, sendo que a Cetamina parece não ter exercido influência significativa neste contexto, de acordo com o indicado pelo teste *post hoc*. Estes dados, em conjunto, indicam que a aplicação de Cetamina, nesta dosagem, não influenciou o processo de condicionamento. O efeito marginalmente significativo observado neste experimento indicou um processo de condicionamento fraco, de modo que processos mais intensos de condicionamento, bem como dosagens distintas ainda podem exercer importante influencias sobre o processo de condicionamento, impactando na eficácia de reforçadores condicionados.

Experimento 2.

Neste experimento foram investigados os efeitos da aplicação da Cetamina sobre a eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos. Para este fim, foi utilizado um procedimento de condicionamento faseado em 3 etapas: linha de base, condicionamento e teste. A primeira etapa consistiu em 5 sessões de 40 minutos na presença das barras LO e Tone. Na segunda etapa, de condicionamento, foram 4 sessões de 60 minutos em que as barras de LO e Tone haviam sido removidas e ocorreu o pareamento entre o estímulo LO e o pallet de comida. A terceira etapa, de teste, foram 2 sessões de 40 minutos em que as barras de LO e Tone foram colocadas novamente e ocorram em esquema de extinção. A aplicação do fármaco e veículo salino (10 mg/kg no volume de 1 ml/kg e 1ml/kg, respectivamente) ocorreram 30 minutos antes de cada uma das duas sessões de teste do procedimento de condicionamento. Logo, foi avaliada a hipótese de que a Cetamina não exerceria um papel significativo sobre reforçadores condicionados já aprendidos, de acordo com a literatura previamente discutida na introdução.

Figura 8

Experimento 2- Bloxplot de Tukey – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



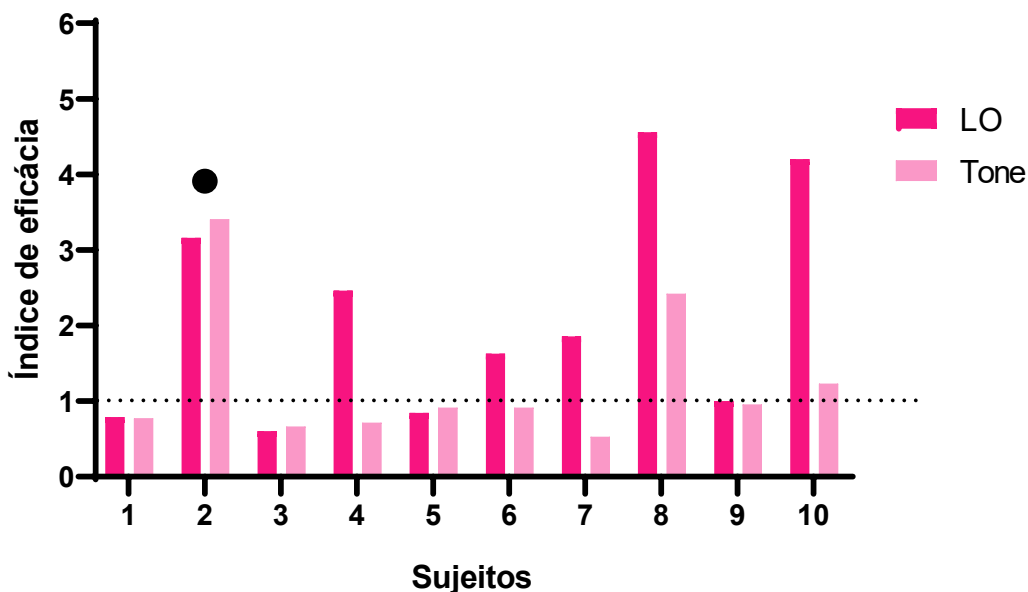
Legenda: Círculo preto preenchido indica a existência de 1 outlier.

O bloxplot de Tukey referente à dispersão do índice de eficácia pelos sujeitos dos grupos Experimental e Controle no experimento 2 (figura 8) indicou a presença de um sujeito outlier: Sujeito 2 do grupo Experimental (discriminado na figura 9). De modo geral, os sujeitos do grupo Experimental apresentaram um padrão distinto do apresentado pelos sujeitos do grupo Controle, mostrando maior aumento nas taxas de respostas na barra LO, assim como uma menor dispersão dos índices de eficácia referentes ao estímulo Tone.

Pode ser notado também que a maioria dos sujeitos desse grupo apresentou redução na taxa de resposta de pressão à barra no estímulo Tone na etapa de teste obtendo um índice inferior a 1. Já o grupo Controle apresentou maior dispersão dos índices de eficácia tanto para as barras de LO como para Tone.

Figura 9

Experimento 2 – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Experimental.

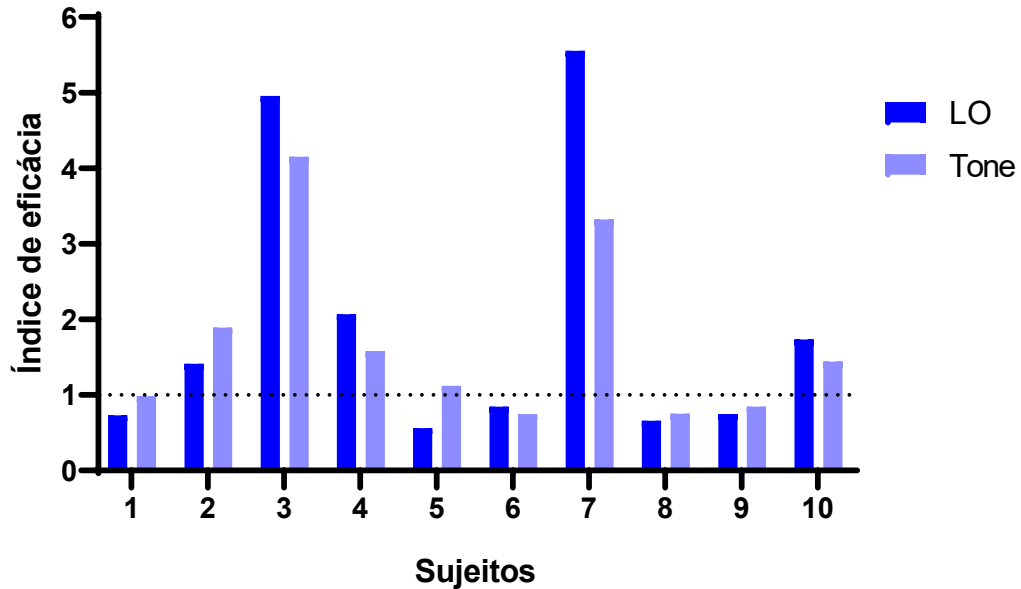


Legenda: O sujeito 2, outlier encontrado na plotagem do boxplot (Figura 8) encontra-se discriminado pelo círculo preto acima do índice de eficácia de LO e Tone apresentado por este sujeito.

A redução da taxa de resposta na barra de estímulo Tone no grupo Experimental pode ser melhor observada pela figura 9, em que 7 de 10 sujeitos do grupo Experimental apresentaram este padrão de comportamento. Embora este padrão tenha sido observado majoritariamente neste grupo, apenas 5 sujeitos evidenciaram aprendizagem de reforçadores condicionados no estímulo LO, sendo estes 4, 6, 7, 8 e 10. Os sujeitos 1, 3, 5 e 9 apresentaram responder indiferenciado entre as barras LO e Tone e apresentaram menor taxa de resposta na etapa de teste em relação à etapa da linha de base. Como descrito anteriormente, o sujeito 2 apresentou um padrão comportamental estatisticamente discrepante quando comparado com os demais integrantes de seu grupo, sendo desconsiderado em tratamentos estatísticos futuros.

Figura 10

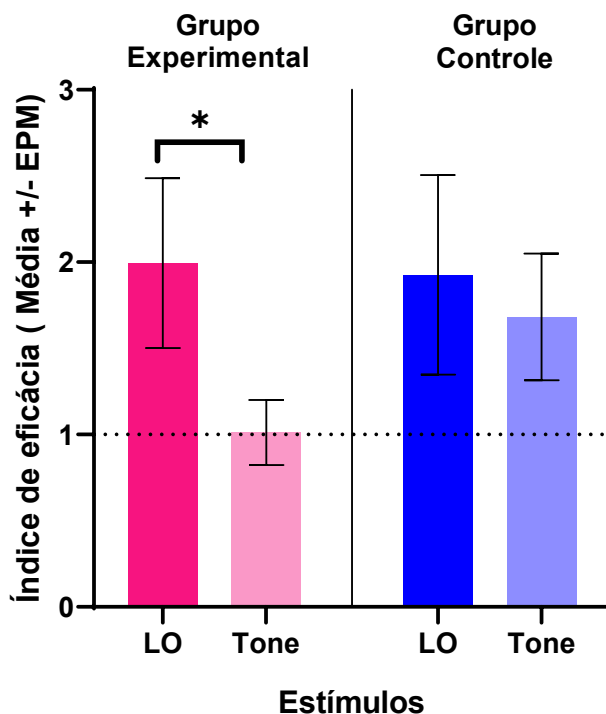
Experimento 2 – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Controle.



Já no grupo Controle (Figura 10) foi observada a formação de reforçadores condicionados para o estímulo LO apenas nos sujeitos 3, 4, 7 e 10. Os sujeitos 1, 2 e 5 apresentaram aumento das taxas de respostas para o estímulo Tone de forma mais intensa que para o estímulo LO, não apresentando evidências do processo de condicionamento. Os sujeitos 6, 8 e 9 apresentaram responder indiferenciado entre as barras de LO e Tone, sendo que as taxas de respostas entre essas barras foram inferiores na etapa de teste em relação a linha de base, sendo indicado pelo índice inferior a um.

Figura 11

Experimento2 – Índice médio de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



Legenda: * $P < 0,05$.

Quando realizado o tratamento estatístico do índice de eficácia no grupo Experimental e Controle (Figura 11) por meio da ANOVA de duas vias, pode ser observado um efeito significativo no fator principal de Barra [$F(1, 17) = 7,538$, $P = 0,0138$]. Não foi observado efeito significativo no fator principal de tratamento [$F(1, 17) = 0,2697$, $P = 0,61$], bem como interação entre estes fatores [$F(1, 17) = 2,737$, $P = 0,1164$]. A análise por meio do teste de comparação múltipla de Sidak indicou que uma diferença estatisticamente significativa no desempenho dos sujeitos do grupo Experimental referente ao índice de eficácia entre os estímulos LO e Tone ($P = 0,015$), não sendo encontrado igual efeito para o grupo Controle ($P = 0,6851$). Estes dados indicam que a Cetamina, quando aplicada de forma aguda 30 minutos antes das sessões de teste,

exerceu o efeito de aumento da eficácia de LO como reforçador condicionado comparando com o estímulo Tone.

Discussão experimento 2

Ao observar o desempenho individual do grupo Experimental, pode ser considerado “ideal” a ocorrência do processo de condicionamento em 3 sujeitos que apresentaram aumento da taxa de respostas em LO e, simultaneamente, a redução das taxas de respostas na barra de Tone. O Sujeito 8 e 10 apresentaram também o aumento da frequência de respostas em Tone, dessa forma pode-se considerar que o processo de condicionamento neste caso foi intermediário. Dessa maneira, 5 sujeitos do grupo Experimental (50% da amostra) evidenciou condicionamento de LO como um reforçador condicionado. No restante deste grupo ou foi apresentado um responder indiferenciado entre LO e Tone e/ou redução das taxas de respostas inferiores às apresentadas na linha de base, indicando a ausência do processo condicionamento pelo responder destes animais.

Já no grupo Controle não pode ser observado processo de condicionamento claro e/ou evidente como no grupo Experimental. Mesmo com 4 sujeitos (40% da amostra) apresentando o índice de eficácia superior a um para LO, indicando um aumento na taxa de resposta na barra LO, este foi acompanhado por aumento simultâneo na taxa de resposta na barra Tone, mesmo que em menor intensidade. Este fato em consonância com a ausência da evidência de condicionamento nos 6 sujeitos (60% da amostra) restante da amostra indicam a possibilidade da existência de fatores espúrios influenciando negativamente o desempenho dos animais do grupo Controle neste experimento.

A ANOVA de duas vias indicou a presença de um efeito significativo provocado pelo procedimento de condicionamento indicado pelo fator principal de Barra [$F(1, 17) = 7,538$ $P = 0,0138$]. O teste de análise de comparação múltipla de Sidak indicou um efeito significativo do processo de condicionamento exclusivamente nos animais do grupo Experimental,

apontando para um efeito positivo produzido pela aplicação da Cetamina no desempenho dos animais neste experimento.

Dessa maneira, duas leituras dos dados são possíveis; uma possibilidade é a de que a Cetamina, enquanto ainda presente no organismo, modulou positivamente a eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos, um efeito análogo a agonistas dopaminérgicos (Beninger et al., 1989; Phillips & Fibiger, 1990; Smith et al., 1997), fator que é corroborado devido a afinidade da cetamina a receptores D2 (Kapur & Seeman, 2001). Uma leitura alternativa a esta conclusão pode ser o próprio momento de aplicação da injeção, 30 minutos antes das sessões de teste, que pode ter influenciado negativamente o desempenho dos animais do grupo Controle, se configurando como um potencial fator espúrio. A Cetamina neste contexto, pode ter exercido um efeito preventivo aos impactos do estresse da injeção, o que abre margem para um possível efeito ansiolítico associado a ação desse fármaco devido às suas propriedades sedativas e dissociativas.

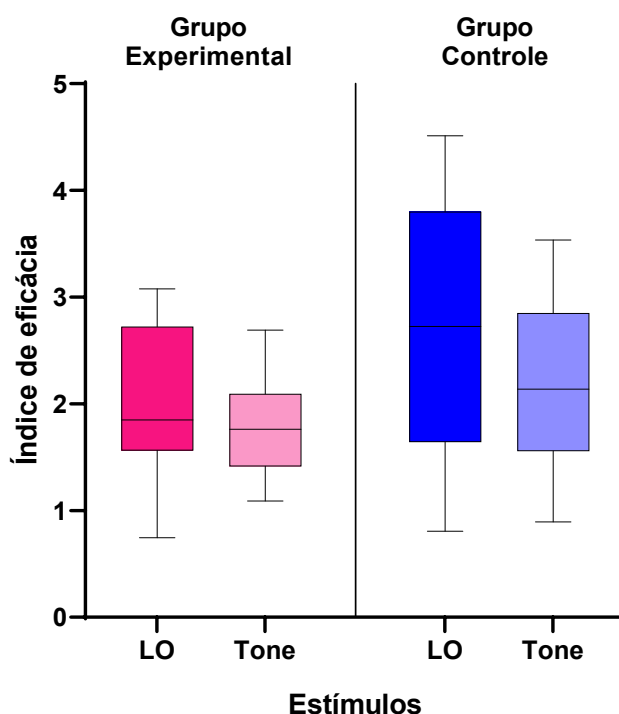
Experimento 3

Neste experimento foram analisados os impactos produzidos pelos efeitos tardios da cetamina sobre o processo de condicionamento de novos reforçadores condicionados. Para este fim, foi utilizado um procedimento de condicionamento faseado em 3 etapas: linha de base, condicionamento e teste. A primeira etapa consistiu em 5 sessões de 40 minutos na presença das barras LO e Tone. Na segunda etapa, de condicionamento, foram 4 sessões de 60 minutos em que as barras de LO e Tone haviam sido removidas e ocorreu o pareamento entre o estímulo LO e o pallet de comida. A terceira etapa, de teste, foram 2 sessões de 40 minutos em que as barras de LO e Tone foram colocadas novamente e ocorreram em esquema de extinção. A aplicação de Cetamina e veículo salino foi realizada em dose única no grupo Experimental e no grupo Controle (10 mg/kg no volume de 1 ml/kg e 1ml/kg, respectivamente) com 24 horas

de antecedência da etapa de condicionamento. Foi avaliada a hipótese de que os efeitos tardios desencadeados pela aplicação deste fármaco impactariam positivamente no processo de condicionamento, intensificando e/ou facilitando este processo.

Figura 12

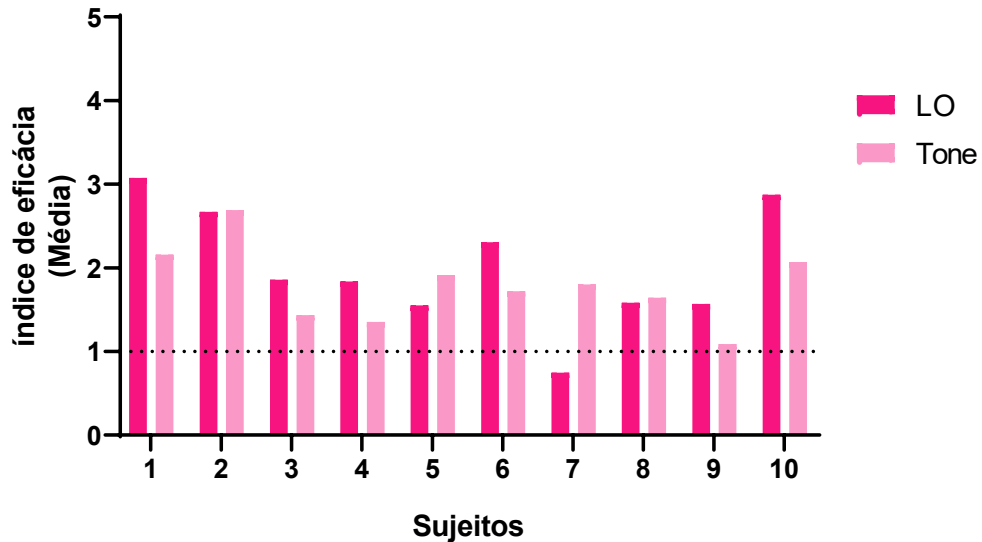
Experimento 3- Bloxplot de Tukey – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



O bloxplot de Tukey referente à dispersão do índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Experimental e Controle no experimento 3 (Figura 12) indicou a ausência de outliers entre os integrantes de ambos os grupos. De maneira geral, foi observada uma maior dispersão do índice de eficácia entre os sujeitos do grupo Controle, quando comparados com os sujeitos do grupo Experimental, tanto para o estímulo LO como para Tone. Em ambos os grupos pode ser notada uma menor dispersão do índice de eficácia do estímulo Tone do que em LO, sendo no grupo Experimental essa redução observada de forma mais intensa.

Figura 13

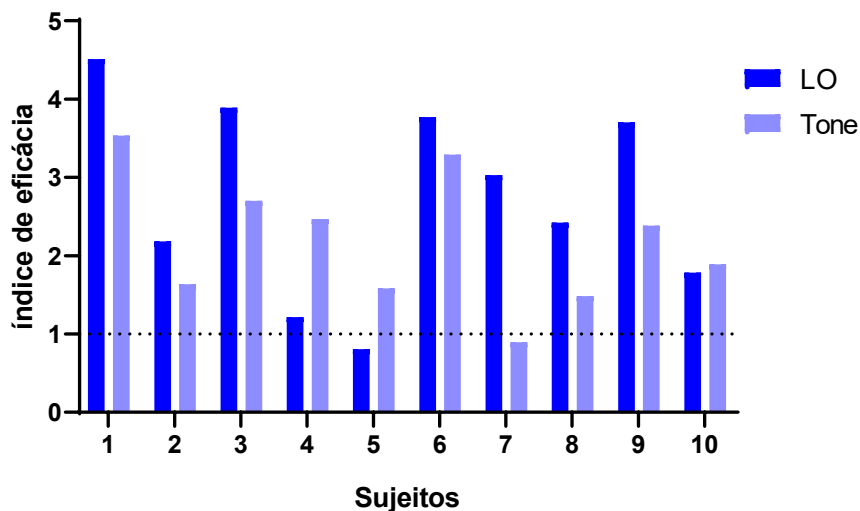
Experimento 3 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Experimental.



O desempenho geral do grupo Experimental possibilitou a observação de um aumento simultâneo das taxas de respostas tanto na barra LO como na barra Tone (índice superior a 1). A análise individual deste grupo (Figura 13), apresentou evidências do o processo de formação de reforçadores condicionados no estímulo LO para os sujeitos 1, 3, 4, 6, 9 e 10, devido a índices superiores a um para o estímulo LO e maiores que o índice do estímulo Tone. Dessa maneira, 60% da amostra evidenciou o processo de aprendizagem do reforço condicionado. Enquanto isso, no restante da amostra, houve o aumento específico da taxa de resposta para o estímulo Tone pelos sujeitos 5 e 7. Foi, também, observado índice superior a 1 de forma inespecífica entre as barras LO e Tone pelos sujeitos 2 e 8. Por conseguinte, estes 4 sujeitos (40% da amostra) não apresentaram evidências de terem sido condicionados.

Figura 14

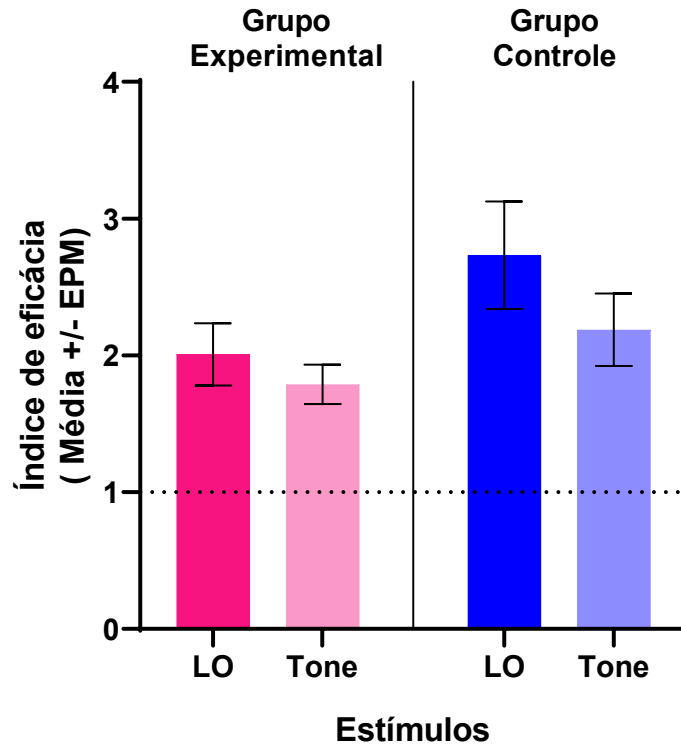
Experimento 2 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Controle.



O grupo Controle (Figura 14), de modo geral apresentou índices de eficácia superiores aos observados no gráfico individualizado do grupo Experimental. Individualmente, os sujeitos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 apresentaram aumento específico das taxas de respostas na barra do estímulo LO, representando 70% da amostra. Foi observado concomitante ao aumento da taxa de resposta na barra LO, o aumento das taxas de resposta na barra Tone para a maioria destes animais, porém em menor medida, indicando a ocorrência do processo de condicionamento. Já os sujeitos 4 e 5 apresentaram aumento específico das taxas de resposta para a barra Tone, indicando ausência do processo de condicionamento. O sujeito 10, por sua vez, apresentou um aumento indiferenciado das taxas de respostas em relação ao estímulo LO e Tone expresso por índices de eficácia superiores a um e numericamente semelhantes, também não evidenciando processo de condicionamento.

Figura 15

Experimento 3 – Índice médio de eficácia dos estímulos LO e Tone.



O tratamento estatístico realizado pela ANOVA de duas vias do índice de eficácia de reforçadores no grupo Experimental e Controle entre os estímulo LO e Tone (Figura 15) indicou de efeito marginalmente significativo no fator principal de barra [$F(1, 18) = 4,182, P = 0,0558$], mas não no fator de tratamento neste experimento [$F(1, 18) = 2,768, P = 0,1135$]. Além disso, não foi observada interação entre estes fatores [$F(1, 18) = 0,7586, P = 0,3952$]. A análise por meio do teste de comparações múltiplas de Sidak, por sua vez, também não indicou efeitos significativos tanto para grupo Experimental ($P = 0,6605$) como para o grupo Controle ($P = 0,105$). Apesar de o tratamento estatístico não ter indicado importantes diferenças no desempenho dos grupos analisados, pode ser notado que o grupo Controle apresentou, de modo geral, maiores índices de eficácia que o grupo Experimental para ambos os estímulos.

Discussão experimento 3.

Neste experimento, apenas o sujeito 7 do grupo Controle apresentou evidência de um processo de condicionamento claro de acordo com o critério de aumento da taxa respostas (índice superior a um) na barra do estímulo LO simultaneamente à redução das taxas de resposta na barra Tone (índice inferior a um). Os outros sujeitos que apresentaram evidências da ocorrência de condicionamento também apresentaram o índice de eficácia para o estímulo Tone ser superior a um, indicando a existência de possíveis variáveis espúrias influenciando neste experimento. Estas variáveis serão melhor discutidas na sessão de discussão final.

Por efeito da aplicação do veículo salino e Cetamina terem ocorrido 24 horas antes das sessões de condicionamento a hipóteses da influência do stress da aplicação da injeção, levantadas no experimento anterior, não se sustentou neste experimento, nem no próximo (experimento 4) a ser aprestado e discutido. Embora a ANOVA não tenha indicado efeitos estatísticos, pode ser observado um valor de P muito próximo ao significativo para o fator principal de barra ($P=0,0558$), podendo ser interpretado como um efeito marginalmente significativo. Nessa conjuntura, estes dados indicaram que o procedimento de condicionamento teve impacto sutil para ambos os grupos, sendo ambos os grupos impactados de forma semelhante de acordo com a análise realizada.

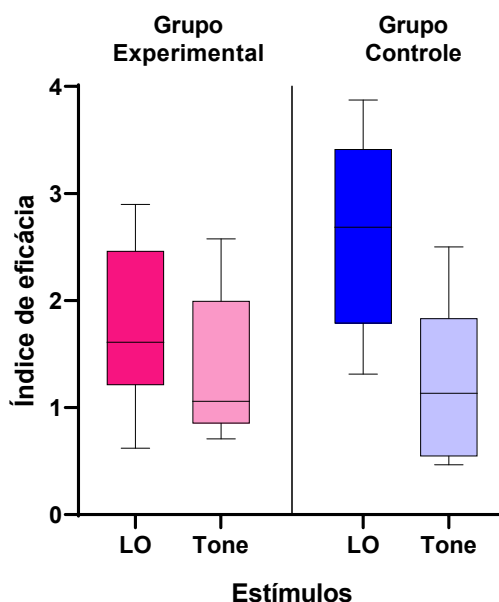
Experimento 4.

Por fim, neste último experimento foi avaliada a influência da ação de longo prazo produzida pela Cetamina em reforçadores condicionados previamente aprendidos. Para este fim, foi utilizado um procedimento de condicionamento faseado em 3 etapas: linha de base, condicionamento e teste. A primeira etapa consistiu em 5 sessões de 40 minutos na presença das barras LO e Tone. Na segunda etapa, de condicionamento, foram 4 sessões de 60 minutos em que as barras de LO e Tone haviam sido removidas e ocorreu o pareamento entre o estímulo LO e o pallet de comida. A terceira etapa, de teste, foram 2 sessões de 40 minutos em que as

barras de LO e Tone foram colocadas novamente e ocorreram em esquema de extinção. A Cetamina e veículo salino foram aplicados (10 mg/kg no volume de 1 ml/kg e 1ml/kg, respectivamente) 24 horas antes da primeira sessão de teste. Foi avaliada a hipótese de que a Cetamina exerça um efeito positivo na eficácia de reforçadores condicionados já estabelecidos. Dessa maneira, a hipótese avaliada neste experimento é de que a Cetamina influenciaria positivamente a eficácia de LO devido a seus efeitos sinaptogênicos tardios.

Figura 16

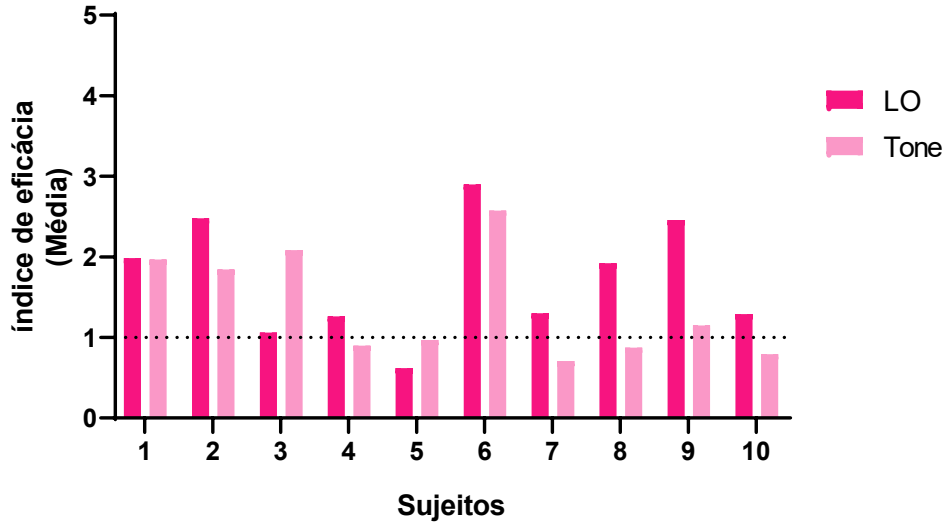
Experimento 4- Bloxplot de Tukey – Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone para os grupos Experimental e Controle.



A plotagem da dispersão do índice de eficácia dos estímulos reforçadores LO e Tone no *boxplot* de Tukey referente ao grupo Experimental e Controle (Figura 16) indica a ausência de outliers na amostra utilizada no experimento 4. De modo geral, observa-se que o grupo Controle apresentou dispersão dos dados em maiores índices de eficácia do que o grupo Experimental, tanto para o estímulo Tone, como para LO. O grupo Controle também apresentou maior diferença entre as medianas LO e Tone e, por consequência, maior diferença das áreas de dispersão dos índices de eficácia do que os índices do grupo Experimental.

Figura 17

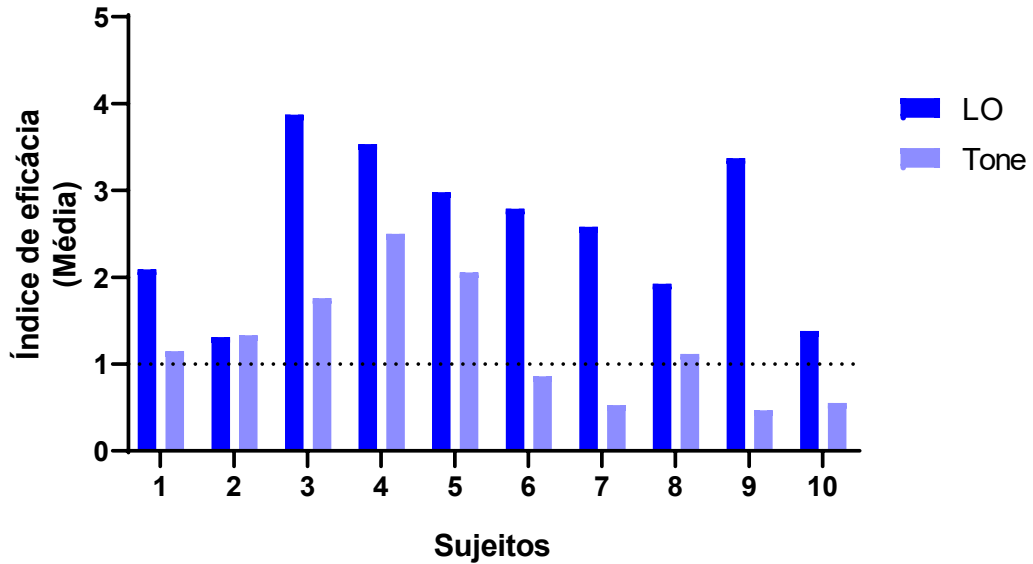
Experimento 4 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Experimental.



O desempenho obtido pelos sujeitos do grupo Experimental (Figura 17), de modo geral, foi uniforme, oscilando entre índice um e três para LO. Individualmente, os sujeitos que evidenciaram o processo de condicionamento do estímulo LO como reforçador condicionado foram os 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10. O sujeito 3 apresentou aumento das taxas de resposta na barra Tone (índice superior a um), enquanto que o sujeito 5 apresentou redução das taxas respostas para o estímulo LO (índice menor que 1) e manutenção da taxa de respostas na barra Tone (índice igual a 1), não demonstrando terem aprendido LO como um reforçador condicionado. O sujeito 1 apresentou responder indiferenciado frente a LO e Tone, também não demonstrando aprendizagem.

Figura 18

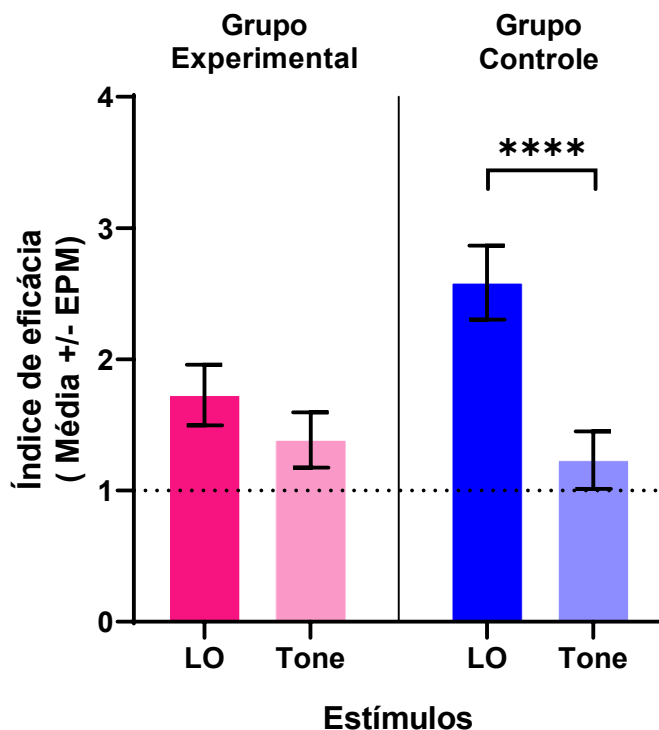
Experimento 4 - Índice de eficácia dos estímulos LO e Tone no grupo Controle.



Os sujeitos do grupo Controle, por outro lado, apresentaram quase de forma unânime o processo de condicionamento do estímulo LO como reforçador, 9 dos 10 sujeitos presentes neste grupo apresentaram índices de eficácia superiores a 1, representando 90% da amostra. A única exceção foi o sujeito 2, que apresentou um aumento da taxa de resposta de forma indiferenciada para os estímulos LO e Tone na etapa de teste em comparação com a etapa de linha de base (Figura 18).

Figura 19

Experimento 4 – Índice médio de eficácia dos estímulos LO e Tone.



Legenda: **** P < 0,001.

A ANOVA de duas vias referente ao índice de eficácia obtido a partir do desempenho dos animais dos grupos Experimental e Controle (Figura 19) no experimento 4, indicou efeito significativo no fator principal de barra [$F(1, 18) = 23,97, P = 0,0001$], não sendo observado efeito significativo no fator principal de tratamento [$F(1, 18) = 1,500, P = 0,2365$]. Embora não tenha sido observado efeito significativo simultâneo em ambos os fatores, foi indicado pelo tratamento estatístico a interação entre os fatores de barra e tratamento [$F(1, 18) = 8,518, P = 0,009$]. A análise de comparações múltiplas de Sidak indicou efeito significativo na comparação do índice de eficácia entre as barras de LO e Tone apenas referente ao grupo Controle ($P < 0,0001$). Nesse contexto de análise, a aplicação de Cetamina 24 horas antes da sessão de teste parece ter influenciado o desempenho dos animais nesse experimento reduzindo a eficácia de

LO como reforçador condicionado. Embora tenha sido observado este impacto, ainda pode ser observado o aumento das taxas de respostas de pressão a barra em LO quando comparados linha de base e teste sendo representado pelo índice superior a 1, indicando a ocorrência do processo de condicionamento.

Discussão experimento 4.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que a Cetamina parece exercer um papel inibidor na eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos. A ANOVA de duas vias apresentou um efeito principal de barra [$F(1, 18) = 23,97, P = 0,0001$] e a interação entre esses fatores [$F(1, 18) = 8,518, P = 0,009$], indicando que os animais de ambos os grupos apresentaram, de forma geral, respostas em frequência distinta entre as barras LO e Tone. A interação entre estes fatores pode ser interpretada que ambos os grupos apresentaram um padrão similar de comportamento. O teste de comparações múltiplas de Sidak indicou que o procedimento de condicionamento respondente teve impactos significativos apenas para o grupo Controle, permitindo a conclusão de que neste delineamento Experimental a Cetamina parece ter exercido efeitos deletérios sobre a eficácia de reforçadores condicionados já aprendidos.

Individualmente, no grupo Controle, observa-se um alto número (90% da amostra) de sujeitos que formaram reforçadores condicionados com sucesso, sendo que 40% da amostra apresentou o que foi considerado como um condicionamento “ideal” em que há a redução das taxas de respostas na barra Tone simultâneo ao aumento das respostas na barra LO. Seguido por estes sujeitos, 20% da amostra ficou muito próxima deste desempenho e os demais 30% que embora tenham apresentado um aumento específico das taxas de respostas em LO, também apresentaram, em menor intensidade, aumento para Tone.

Ao analisar o desempenho individual dos sujeitos do grupo Experimental, em contrapartida, foi observado que a Cetamina exerceu o papel de reduzir a eficácia do LO

enquanto reforçador condicionado sem, no entanto, inibi-lo completamente. De modo geral, pode ser observado processo de condicionamento para 70% da amostra, no entanto é notado que os sujeitos deste grupo apresentaram índices não só mais uniformes, como também menos discrepantes entre LO e Tone quando comparados com o grupo Controle, como apresentado pela figura 16 e 19. Analisando a efetividade do processo de condicionamento é visto um processo de condicionamento “ideal” para 40% da amostra, da mesma forma que para o grupo Controle, entretanto este efeito mostrou-se mais sutil. O restante da amostra que evidenciou aprendizagem de reforçadores condicionados (30%) também apresentou aumento da taxa de resposta em Tone.

Estes dados apontam para a Cetamina exercer um efeito inibitório persistente e seletivo sobre reforçadores condicionados previamente aprendidos. Estes dados indicam que este efeito ocorreu de forma específica para o estímulo LO, uma vez que não foi observado um efeito semelhante em Tone, levantando a hipótese que os efeitos tardios provocados pela aplicação da Cetamina possam atuar de forma específica na eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos.

Resultados gerais

Tabela 2

Relação entre número de animais condicionados x Efeitos estatísticos significativos

Expe rime nto	Nº de animais condicionados		Efeitos principais significativo		Teste <i>Post Hoc</i> significativo	
	Experimental	Controle	Experimental	Controle	Experimental	Controle
1	4/10	8/10			Barra F (1, 18) = 4,030 P = 0,0599	Marginal **
2	5/9*	4/10			Barra F (1, 17) = 7,538 P = 0,0138	Significa tivo** P = 0,015
3	6/10	7/10			Barra F (1, 18) = 4,182 P = 0,0558	Marginal **
4	7/10	9/10			Barra F (1, 18) = 23,97 P = 0,0001 Interação Barra x Tratamento F (1, 18) = 8,518, P = 0,009	Significa tivo** P < 0,0 00 1

Legenda: * Outlier desconsiderado nesta tabela. ** Indica se o efeito foi marginal (P próximo de 0,05) ou significativo (P ≤ 0,05).

A Tabela 2 sintetiza os dados dos 4 experimentos, apenas referentes aos efeitos estatísticos marginalmente significativos e significativos. Em síntese, no experimento 1 foi observado um efeito marginalmente significativo referente ao fator principal de barra [F (1, 18) = 4,030, P = 0,0599]. No experimento 2, pode ser observado um efeito no fator principal de barra significativo [F (1, 17) = 7,538, P = 0,0138], bem como o teste *post hoc* significativo para o grupo experimental (P = 0,015). No experimento 3, assim como no experimento 1, observa-se um efeito marginalmente significativo [F (1, 18) = 4,182, P = 0,0558]. Por fim no experimento 4, houve um efeito no fator principal de barra [F (1, 18) = 23,97, P = 0,0001] e a interação entre os fatores de barra e tratamento [F (1, 18) = 8,518, P = 0,009]. O *test post hoc* neste experimento indicou um efeito significativo para o grupo controle (P < 0,0001). A síntese aqui presente nesta tabela será discutida na próxima sessão.

DISCUSSÃO FINAL

Os dados coletados e analisados neste trabalho permitem algumas inferências gerais sobre os impactos da Cetamina sobre o processo de condicionamento respondente. A tabela 2 sintetiza os dados referentes aos experimentos aqui realizados. A partir do experimento 1, tem-se que Cetamina não parece ter exercido impacto significativo durante o processo de condicionamento. No entanto, pode ser observado um efeito estatístico marginalmente significativo para o fator principal de Barra neste experimento [$F(1, 18) = 4,030, P = 0,0599$] (Tabela 2), este dado abre margem para replicação deste estudo alterando variáveis que podem ter comprometido a aprendizagem destes animais, como momento de aplicação do fármaco, dosagem ou regime de privação, por exemplo.

Dessa maneira, poderia se excluir a hipótese da influência do stress devido à aplicação do fármaco/veículo salino. No caso da alteração da dosagem, se clarificaria o efeito dose-dependente do fármaco sobre o processo de condicionamento, dado que é observado o uso de diferentes dosagens na literatura, sendo que dosagens mais altas produzem efeitos distintos de menores dosagens (Autry et al., 2011; Engin et al., 2009; Maeng et al., 2008; Zanos et al., 2015, 2016). Já o regime de privação embora não tenha impactado individualmente de forma significativa é uma variável que pode ter influenciado em uma maior agitação dos animais de modo geral (File & Day, 1972). Este padrão de comportamento impacta diretamente sobre o desempenho dos animais na tarefa exigida em todos os experimentos, podendo levar a um responder mais inespecífico, não só em função da etapa de teste ocorrer ao final do experimento, como também por esta etapa ocorrer em contingência de extinção. Logo, uma privação mais restritiva levaria os animais a apresentarem alta frequência de comportamentos exploratórios

por comida, assim como uma privação mais branda poderia dificultar o processo de condicionamento.

No que se refere à modulação da eficácia reforçadora de reforçadores condicionados já aprendidos, investigados no experimento 2, parece que a Cetamina exerceu um papel positivo. Todavia a razão deste efeito não ficou totalmente clara, existindo abertura para múltiplas interpretações deste resultado. Primeiramente, este dado pode indicar que a Cetamina teria um efeito de intensificar a eficácia do estímulo LO como um reforçador condicionado, um efeito análogo ao observado por agonistas dopaminérgicos (Beninger et al., 1989; Phillips & Fibiger, 1990; Smith et al., 1997). Outra interpretação possível para o fenômeno observado é de que este fármaco poderia exercer um efeito ansiolítico nos animais (Papp et al., 2017), dado que o estresse da imobilização e aplicação do fármaco e veículo salino podem ter influenciado o desempenho dos animais durante as sessões de teste. Isto foi observado pela análise *post hoc*, que indicou um efeito específico para o grupo experimental em confluência com a observação de que neste experimento foi observado o menor número de animais no grupo controle condicionados (Tabela 2). Em síntese, estes dois experimentos parecem indicar que o bloqueio de receptores NMDA promovidos pela ação da Cetamina de forma aguda não influenciam de forma significativa a aprendizagem de reforçadores condicionados, mas parecem impactar positivamente na eficácia reforçadores condicionados já aprendidos.

Uma possível leitura do que pode ter acontecido em nível neurofisiológico é que o bloqueio parcial dos receptores NMDA promovidos pela Cetamina pode ter facilitado a comunicação da circuitaria glutamatérgica por meio da inibição de interneurônios inibitórios (Aleksandrova & Phillips, 2021). Este processo de desinibição, por sua vez, pode ter resultado em uma maior secreção de glutamato por neurônios piramidais glutamatérgicos em diferentes regiões do SNC (Aleksandrova & Phillips, 2021). Segundo modelo discutido neste trabalho (Galaj & Ranaldi, 2021; Ranaldí et al., 2011), na região do VTA, a maior concentração de glutamato pode

ter facilitado a ativação de neurônios dopaminérgicos implicados na sinalização do reforço. Considerando que o processo plástico de aumento da concentração de receptores AMPA já teria ocorrido devido ao processo de condicionamento (Galaj & Ranaldi, 2021), haveria fortalecimento da conexão entre a circuitaria glutamatérgica implicada na sinalização associada ao estímulo de LO e a circuitaria dopaminérgica na região. A Cetamina presente no organismo pode ter intensificado essa via de sinalização por meio da desinibição dessa circuitaria, tornando LO mais eficaz na seleção das respostas contingente à sua apresentação devido a maior atividade dopaminérgica, explicando os resultados obtidos pelo experimento 2. Em adição a essa leitura um efeito paralelo a este descrito é da Cetamina ter exercido uma ação análoga a de estimulante devido a sua afinidade a receptores D2(Kapur & Seeman, 2001), o que poderia explicar a potencialização de reforçadores condicionados(Beninger et al., 1989; Phillips & Fibiger, 1990; Smith et al., 1997) .

Os experimentos 3 e 4 contribuem na compreensão dos efeitos tardios promovidos pela Cetamina na medida em que pode ser observado um efeito significativo sobre os impactos desse fármaco em reforçadores já aprendidos, como observado no experimento 4. No que tange o terceiro experimento, a Cetamina não parece ter exercido influência significativa na aprendizagem de reforçadores condicionados. Um ponto importante que poderia explicar este dado seria a escolha de aplicação da Cetamina 24 horas antes das sessões de condicionamento, de acordo com Wu, Savalia e Kwan (2021) a Cetamina exerce a maior parte de seu efeito plástico entre 2 e 12 horas após sua aplicação.

O experimento 4, por sua vez, indicou que Cetamina reduziu a eficácia de reforçadores condicionados previamente aprendidos. Embora Wickham et al. (2015) tenha analisado fenômeno semelhante ao aplicar AP-5 na região do VTA imediatamente antes do teste de condicionamento, ou seja, observado este efeito enquanto os receptores NMDA estavam sob ação de seu antagonista, os resultados aqui parecem indicar que o efeito do bloqueio desses

receptores promove a atenuação de reforçadores condicionados a longo prazo. Uma possível interpretação para o fenômeno aqui observado baseado na constatação de Wu et al. (2021) referente a uma janela crítica na ocorrência de processos plásticos, pode ser que os efeitos plásticos promovidos pela aplicação da Cetamina após a quarta sessão de condicionamento podem ter provocado alteração nesta circuitaria de modo a atenuar o processo de condicionamento devido a uma reestruturação dessas circuitarias tendo em vista à recente aprendizagem.

O estudo aqui realizado possuiu algumas limitações importantes que ou podem ter influenciado nos dados aqui obtidos ou impactam em possíveis generalizações a partir do que foi discutido. Em primeiro, lugar tem-se que este procedimento propositalmente se constitui enquanto um delineamento experimental da análise da eficácia de reforçadores condicionados de forma mais sutil, o que implica em um processo de condicionamento respondente menos intenso. Esta escolha foi utilizada devido a maior sensibilidade a possíveis variáveis que possam atuar neste processo, no entanto, também o torna mais sensível a variáveis espúrias.

Uma das variáveis que podem ter exercido uma influência significativa nos dados obtidos foi o regime de privação adotado, pois os animais consumiram quantidades diferentes de alimento e foi necessário corrigir o tempo de exposição ao alimento em sessões específicas ao se constatar perda de peso de alguns dos sujeitos por duas sessões consecutivas. Este fato, pode ter ocasionado em uma maior frequência de comportamentos exploratórios (File & Day, 1972) resultando em uma distribuição de respostas entre LO e Tone de forma mais inespecífica. Embora este possa ter sido um fator de influência nos resultados seria considerado um fator de influência geral para todos os sujeitos, dado que apenas um outlier foi encontrado neste experimento.

No experimento 4 foi observado um padrão comportamental que se diferenciou dos dados obtidos referentes ao desempenho dos grupos Controles nos demais experimentos. Essa

diferença foi observada de forma visual, uma vez em que não foram realizadas análises estáticas entre experimentos neste estudo. É importante ressaltar que durante o procedimento de coleta, foram executados os experimentos 1 e 2 inicialmente, e depois o 3 e 4 simultaneamente, de modo que a influência de variáveis específicas atuando sobre os animais do experimento 4 são difíceis de serem levantadas.

Outra importante limitação a ser considerada foi o uso de diferentes medicamentos neste experimento (Cetamin® e Dopalen®) embora ambos sejam a mesma mistura racêmica da Cetamina, foi observado que os sujeitos tratados com Cetamin® apresentaram sinais comportamentais de aumento de atividade motora associados com a perda de coordenação motora, característicos do efeito sedativos. Essa diferença traz importantes ressalvas quanto à qualidade do fármaco Dopalen® e seu impacto nos dados aqui obtidos, sendo indicada utilização de produtos de farmacêuticas alternativas.

Em conclusão, embora os dados encontrados neste estudo refutem todas as hipóteses levantadas no início desta dissertação, pode ser observado que a cetamina de alguma forma mostrou-se como importante moduladora dos processos de reforço. Por conseguinte, a realização de mais estudos que de proponham a avaliar, descrever e caracterizar estes impactos a nível comportamental e neurofisiológicos tornam-se cada vez mais oportunos para uma melhor compreensão, não só dos mecanismos neurofisiológicos do reforço, mas também do seu papel como um antidepressivo. Os resultados aqui indicam que para além de uma possível modulação da sensibilidade dos sujeitos ao reforço, neste contexto condicionado, a Cetamina parece exercer um efeito distinto a depender do intervalo de aplicação em animais sadios. Este ponto é relevante de ser ressaltado, na medida em que os procedimentos experimentais aqui consultados se referem a organismos submetidos a algum protocolo de estresse e/ou intervenção farmacológica que mimetiza um quadro sintomatológico patológico (Autry et al., 2011; Duman et al., 2012; Engin et al., 2009; Koike et al., 2011; Li et al., 2010, 2011; Maeng et al., 2008;

Papp et al., 2017; Popik et al., 2008; Viana et al., 2021; Zanos et al., 2015, 2016). Logo, observar estes efeitos em animais sadios abre margem para um novo campo de exploração na mesma medida em que nos ajuda a interpretar os dados aqui apresentados. Por se tratar de indivíduos sadios, os processos plásticos promovidos pela Cetamina, bem como seu efeito imediato, são circunscritos a um contexto distinto do observado em sujeitos submetidos ao protocolo de estresse. Este fator em adição aos pontos aqui previamente apontados e discutidos, como delineamento experimental adotado, dosagem do fármaco, tempo de aplicação pré experimento e regime de privação, podem ser variáveis importantes nos dados aqui observados.

Proposta para estudos futuros

A partir dos dados aqui apresentados e literatura discutida seria de grande contribuição para uma mais profunda compreensão dos efeitos comportamentais promovidas pela Cetamina a execução de novos estudos que repliquem este experimento para produção de um corpo mais robustos dos achados aqui realizados. Para além da replicação destes experimentos, uma importante lacuna que permaneceu neste estudo foi a influência de diferentes dosagens da Cetamina neste processo de aprendizagem de modo a ser possível uma descrição dos impactos deste fármaco de forma dose-dependente utilizando as dosagens mais comuns usadas na literatura (0,5 a 10 mg/kg). Para além do efeito dose-dependente, um importante complemento seria a realização do procedimento de condicionamento em diferentes momentos da janela de plasticidade promovida pela Cetamina como apontado por Wu et al. (2021). Elucidando os aspectos principais da ação deste fármaco em curto e médio prazo.

Este estudo também abriu possíveis janelas para estudos que adaptem este delineamento experimental alterando o tempo/intensidade do processo de condicionamento e a resistência à extinção respondente do reforçador condicionado. Como apontado por Tomanari (2000), analisar a resistência a extinção pode ser um dos recursos para se avaliar o quão consolidado

um reforço condicionado está a partir da história de condicionamento do organismo. Tendo em vista que este experimento foi especialmente desenhado para produzir um processo de condicionamento sutil, garantindo maior sensibilidade a variáveis, concomitantemente a sendo mais resistente a extinção por meio de um procedimento de condicionamento intermitente da segunda quarta sessão experimental (Knott & Clayton, 1966; Lilliquist et al., 1999). Seria interessante compreender se a cetamina modularia a resiliência de reforçadores condicionados, até mesmo pensando em seu efeito antidepressivo. Por fim, outra linha de estudos que poderia ser estabelecida para o preenchimento de possíveis lacunas deixadas por este estudo seria a hipótese de que os resultados obtidos pelo experimento 2 se deu em função a um possível efeito ansiolítico promovido por este fármaco. De modo que a utilização de 3 grupos em que se aplica cetamina, um fármaco ansiolítico e um controle, poderia elucidar esta questão.

REFERÊNCIAS

- Aleksandrova, L. R., & Phillips, A. G. (2021). Neuroplasticity as a convergent mechanism of ketamine and classical psychedelics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(11), 929–942. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.08.003>
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P. F., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475(7354), 91–96. <https://doi.org/10.1038/nature10130>
- Baum, W. M. (2006). *Compreender o behaviorismo: ciência, comportamento e cultura*. (2^o ed). ARTMED.
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2014). Restoring Mood Balance in Depression: Ketamine Reverses Deficit in Dopamine-Dependent Synaptic Plasticity. *Biological Psychiatry*, 76(12), 927–936. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.014>
- Beninger, R. J., Hoffman, D. C., & Mazurski, E. J. (1989). Receptor subtype-specific dopaminergic agents and conditioned behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 13(2–3), 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80019-3)
- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant Effects of Ketamine in Depressed Patients. *Biol Psychiatry*, 47, 351–354.
- Butts, D. A., & Kanold, P. O. (2010). The applicability of spike time dependent plasticity to development. Em *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Número JUL). <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2010.00030>
- Cardona-Acosta, A. M., & Bolaños-Guzmán, C. A. (2023). Role of the mesolimbic dopamine pathway in the antidepressant effects of ketamine. *Neuropharmacology*, 225, 109374. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109374>
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição* (4^o ed). ARTMED.
- Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L. Z., Ogawa, Y., Leucht, S., Ruhe, H. G., Turner, E. H., Higgins, J. P. T., Egger, M., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Imai, H., Shinohara, K., Tajika, A., Ioannidis, J. P. A., & Geddes, J. R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment

- of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*, 391(10128), 1357–1366. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32802-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7)
- Clements, J. A., & Nimmo, W. S. (1981). Pharmacokinetics and analgesic effect of ketamine in man. *British Journal of Anaesthesia*, 53(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/bja/53.1.27>
- Costello, C. G. (1972). Depression: Loss of reinforcers of loss of reinforcer effectiveness? *Behavior Therapy*, 3(2), 240–247. [https://doi.org/10.1016/S0005-7894\(72\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(72)80084-4)
- DiazGranados, N., Ibrahim, L. A., Brutsche, N. E., Ameli, R., Henter, I. D., Luckenbaugh, D. A., Machado-Vieira, R., & Zarate, C. A. (2010). Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 71(12), 1605–1611. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05327blu>
- Diazgranados, N., Ibrahim, L., Brutsche, N. E., Newberg, A., Kronstein, P., Khalife, S., Kammerer, W. A., Quezado, Z., Luckenbaugh, D. A., Salvatore, G., Machado-Vieira, R., Manji, H. K., & Zarate, C. A. (2010). A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Archives of General Psychiatry*, 67(8), 793–802. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.90>
- Duman, R. S., Li, N., Liu, R. J., Duric, V., & Aghajanian, G. (2012). Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, 62(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.044>
- Engin, E., Treit, D., & Dickson, C. T. (2009). Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. *Neuroscience*, 161(2), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.038>
- Ferster, C. B. (1973). A functional analysis of depression. *American Psychologist*, 28(10), 857–870. <https://doi.org/10.1037/h0035605>
- File, S. E., & Day, S. (1972). Effects of time of day and food deprivation on exploratory activity in the rat. *Animal Behaviour*, 20(4), 758–762. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80148-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80148-9)
- Fitzpatrick, C. J., & Morrow, J. D. (2017). Subanesthetic ketamine decreases the incentive-motivational value of reward-related cues. *Journal of Psychopharmacology*, 31(1), 67–74. <https://doi.org/10.1177/0269881116667709>
- Galaj, E., & Ranaldi, R. (2021). Neurobiology of reward-related learning. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 124, p. 224–234). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.007>

- Gales, A., & Maxwell, S. (2018). *Cetamina: Evidências Recentes e Usos Atuais*.
www.wfsahq.org/resources/anaesthesia-tutorial-of-the-week
- Garcia-Segura, L. M. (2009). *Hormones and Brain Plasticity* (1º ed). Oxford University Press.
- Garzo'n, M., Garzo'n, G., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., & Pickel, V. M. (1999). Cholinergic Axon Terminals in the Ventral Tegmental Area Target a Subpopulation of Neurons Expressing Low Levels of the Dopamine Transporter. Em *J. Comp. Neurol* (Vol. 410).
- Geisler, S., Derst, C., Veh, R. W., & Zahm, D. S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Neuroscience*, 27(21), 5730–5743.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007>
- Gonçalves, F. L. (2000). *Efeitos da fluoxetina sobre a eficácia de reforçadores condicionados* [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.47.2000.tde-07062006-134421>
- Gonçalves, F. L., & Silva, M. T. A. (1999). *Mecanismos fisiológicos do reforço*.
<https://www.researchgate.net/publication/286190663>
- Grønli, J., Murison, R., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, C. M., & Ursin, R. (2004). Chronic mild stress affects sucrose intake and sleep in rats. *Behavioural Brain Research*, 150(1–2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00252-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00252-3)
- Haas, D. A., & Harper, D. G. (1992). Ketamine: A Review of Its Pharmacologic Properties and Use in Ambulatory Anesthesia. Em *Anesth Prog* (Vol. 39).
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. (2014). *Princípios de Neurociências* (5º ed). Artmed.
- Kapur, S., & Seeman, P. (2001). Ketamine has equal affinity for NMDA receptors and the high-affinity state of the dopamine d2 receptor. *Biological Psychiatry*, 49(11), 954–955.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01110-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01110-6)
- Kelleher, R. T., & Gollub, L. R. (1962). A REVIEW OF POSITIVE CONDITIONED REINFORCEMENT 1. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 5(S4), 543–597. <https://doi.org/10.1901/jeab.1962.5-s543>
- Kessler, R. C., Akiskal, H. S., Ames, M., Birnbaum, H., Greenberg, P., Hirschfeld, R. M., Jin, R., Merikangas, K. R., & Wang, P. S. (2006). The prevalence and effects of mood disorders on work performance in a nationally representative sample of US workers NIH Public Access. Em *Am J Psychiatry* (Vol. 163, Número 9).

- Kingir, E., Sevinc, C., & Unal, G. (2023). Chronic oral ketamine prevents anhedonia and alters neuronal activation in the lateral habenula and nucleus accumbens in rats under chronic unpredictable mild stress. *Neuropharmacology*, 228, 109468.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109468>
- Knott, P. D., & Clayton, K. N. (1966). Durable secondary reinforcement using brain stimulation as the primary reinforcer. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 61(1), 151–153. <https://doi.org/10.1037/h0022879>
- Koike, H., Iijima, M., & Chaki, S. (2011). Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behavioural Brain Research*, 224(1), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.035>
- Kokkinou, M., Ashok, A. H., & Howes, O. D. (2018). The effects of ketamine on dopaminergic function: meta-analysis and review of the implications for neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 23(1), 59–69.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.190>
- Li, N., Lee, B., Liu, R. J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X. Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329(5994), 959–964.
<https://doi.org/10.1126/science.1190287>
- Li, N., Liu, R. J., Dwyer, J. M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., Li, X. Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2011). Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological Psychiatry*, 69(8), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.015>
- Lilliquist, M. W., Nair, H. P., Gonzalez-Lima, F., & Amsel, A. (1999). Extinction after regular and irregular reward schedules in the infant rat: Influence of age and training duration. *Developmental Psychobiology*, 34(1), 57–70.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199901\)34:1<57::AID-DEV7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199901)34:1<57::AID-DEV7>3.0.CO;2-R)
- Lindfors, N., Barati, S., & O'Connor, W. T. (1997). Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Research*, 759(2), 205–212.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00255-2)
- Machado-Vieira, R., Salvadore, G., DiazGranados, N., & Zarate, C. A. (2009). Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Em Pharmacology*

- and Therapeutics* (Vol. 123, Número 2, p. 143–150).
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.010>
- Maeng, S., Zarate, C. A., Du, J., Schloesser, R. J., McCammon, J., Chen, G., & Manji, H. K. (2008). Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biological Psychiatry*, *63*(4), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.028>
- Mazur, J. E. (2012). *Learning & Behavior* (7^o ed). Pearson.
- McKim, W., & Hancock, S. (2011). *Drugs and Behavior: An Introduction to Behavioral Pharmacology*. pearson.
- Mion, G., & Villeveille, T. (2013). Ketamine Pharmacology: An Update (Pharmacodynamics and Molecular Aspects, Recent Findings). *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *19*(6), 370–380. <https://doi.org/10.1111/cns.12099>
- Monteggia, L. M., & Zarate, C. (2015). Antidepressant actions of ketamine: From molecular mechanisms to clinical practice. *Current Opinion in Neurobiology*, *30*, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.12.004>
- Mora, M. S., Nestoriuc, Y., & Rief, W. (2011). Lessons learned from placebo groups in antidepressant trials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1572), 1879–1888. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0394>
- Otte, C., Gold, S. M., Penninx, B. W., Pariante, C. M., Etkin, A., Fava, M., Mohr, D. C., & Schatzberg, A. F. (2016). Major depressive disorder. Em *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>
- Papp, M., Gruca, P., Lason-Tyburkiewicz, M., & Willner, P. (2017). Antidepressant, anxiolytic and procognitive effects of subacute and chronic ketamine in the chronic mild stress model of depression. *Behavioural Pharmacology*, *28*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000259>
- Papp, M., Willner, P., & Muscat, R. (1991). An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. Em *Psychopharmacology* (Vol. 104).
- Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1990). Role of reward and enhancement of conditioned reward in persistence of responding for cocaine. *Behavioural Pharmacology*, *1*(4), 269–282. <https://doi.org/10.1097/00008877-199000140-00002>
- Poleszak, E., Wlaż, P., Szewczyk, B., Wlaż, A., Kasperek, R., Wróbel, A., & Nowak, G. (2011). A complex interaction between glycine/NMDA receptors and

- serotonergic/noradrenergic antidepressants in the forced swim test in mice. *Journal of Neural Transmission*, 118(11), 1535–1546. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0630-9>
- Popik, P., Kos, T., Sowa-Kućma, M., & Nowak, G. (2008). Lack of persistent effects of ketamine in rodent models of depression. *Psychopharmacology*, 198(3), 421–430. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1158-z>
- Price, R. B., Nock, M. K., Charney, D. S., & Mathew, S. J. (2009). Effects of Intravenous Ketamine on Explicit and Implicit Measures of Suicidality in Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 66(5), 522–526. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.04.029>
- Rada, P. V., Mark, G. P., Yeomans, J. J., Hoebel, B. G., Rada, P. V., Mark, G. P., Yeomans, J. J., & Acetylcholine, B. G. H. (2000). Acetylcholine Release in Ventral Tegmental Area by Hypothalamic Self-Stimulation, Eating, and Drinking. Em *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 65, Número 3).
- Ranaldi, R., & Beninger, R. J. (1993). Dopamine D1 and D2 antagonists attenuate amphetamine-produced enhancement of responding for conditioned reward in rats. *Psychopharmacology*, 113(1), 110–118. <https://doi.org/10.1007/BF02244342>
- Ranaldi, R., Kest, K., Zellner, M. R., Lubelski, D., Muller, J., Cruz, Y., & Saliba, M. (2011). The effects of VTA NMDA receptor antagonism on reward-related learning and associated c-fos expression in forebrain. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.026>
- Rescorla, R. A. (1988). Pavlovian conditioning: It's not what you think it is. *American Psychologist*, 43(3), 151–160. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.43.3.151>
- Schultz, W. (2015). Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiol Rev*, 95, 853–951. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2014.-Re>
- Schultz, W., Apicella, P., & Ljungberg, T. (1993). Responses of Monkey Dopamine Neurons to Reward and Conditioned Stimuli during Successive Steps of Learning a Delayed Response Task. Em *The Journal of Neuroscience* (Vol. 13, Número 3).
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. *Science*, 275(5306), 1593–1599. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1593>
- Shahan, T. A. (2010). CONDITIONED REINFORCEMENT AND RESPONSE STRENGTH. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 93(2), 269–289. <https://doi.org/10.1901/jeab.2010.93-269>
- Skinner, B. (1981). Selection by Consequences. *science*, 501–504. <https://www.science.org>

- Skinner, B. F. (1938). *The Behavior of Organisms* (2^o ed, Vol. 1). B. F. Skinner Foundation.
- Smith, J. K., Neill, J. C., Costall, B., & COSTALL Bidirectional, B. (1997). Bidirectional Effects of Dopamine D 2 Receptor Antagonists on Responding for a Conditioned Reinforcer. Em *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 57, Número 4).
- Stahl. (2014). *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas* (4^o ed). Guanabara koogan.
- Steidl, S., Wang, H., Ordonez, M., Zhang, S., & Morales, M. (2017). Optogenetic excitation in the ventral tegmental area of glutamatergic or cholinergic inputs from the laterodorsal tegmental area drives reward. *European Journal of Neuroscience*, 45(4), 559–571. <https://doi.org/10.1111/ejn.13436>
- Strekalova, T., Gorenkova, N., Schunk, E., Dolgov, O., & Bartsch, D. (2006). Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. Em *Behavioural Pharmacology* (Vol. 17). Lippincott Williams & Wilkins.
- Strekalova, T., & Steinbusch, H. W. M. (2010). Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(2), 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.12.014>
- Tan, S., Lam, W. P., Wai, M. S. M., Yu, W.-H. A., & Yew, D. T. (2012). Chronic Ketamine Administration Modulates Midbrain Dopamine System in Mice. *PLoS ONE*, 7(8), e43947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043947>
- Tomanari, G. (2000). Reforçamento condicionado. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 2(1), 61–77.
- Turner, E. H., Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., & De Vries, Y. A. (2022). Selective publication of antidepressant trials and its influence on apparent efficacy: Updated comparisons and meta-analyses of newer versus older trials. *PLoS Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003886>
- Viana, G. S. B., Do Vale, E. M., de Araujo, A. R. A., Coelho, N. C., Andrade, S. M., da Costa, R. O., de Aquino, P. E. A., de Sousa, C. N. S., de Medeiros, I. S., de Vasconcelos, S. M. M., & Neves, K. R. T. (2021). Rapid and long-lasting antidepressant-like effects of ketamine and their relationship with the expression of brain enzymes, bdnf, and astrocytes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 54(2), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1414-431x202010107>

- Wickham, R. J., Solecki, W. B., Nunes, E. J., & Addy, N. A. (2015). Distinct effects of ventral tegmental area NMDA and acetylcholine receptor blockade on conditioned reinforcement produced by food-associated cues. *Neuroscience*, *301*, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.021>
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, *134*(4), 319–329. <https://doi.org/10.1007/s002130050456>
- Willner, P. (2005). Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiology*, *52*(2), 90–110. <https://doi.org/10.1159/000087097>
- Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *16*(4), 525–534. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80194-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80194-0)
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 37, Número 10, p. 2331–2371). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. In *Psychopharmacology* (Vol. 93).
- Wu, H., Savalia, N. K., & Kwan, A. C. (2021). Ketamine for a Boost of Neural Plasticity: How, but Also When? *Biological Psychiatry*, *89*(11), 1030–1032. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.03.014>
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C. R., Urakubo, H., Ishii, S., & Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, *345*(6204), 1616–1620. <https://doi.org/10.1126/science.1255514>
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G. I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H. J., Singh, N. S., Dossou, K. S. S., Fang, Y., Huang, X. P., Mayo, C. L., Wainer, I. W., Albuquerque, E. X., Thompson, S. M., Thomas, C. J., Zarate, C. A., & Gould, T. D. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, *533*(7604), 481–486. <https://doi.org/10.1038/nature17998>
- Zanos, P., Piantadosi, S. C., Wu, H. Q., Pribut, H. J., Dell, M. J., Can, A., Snodgrass, H. R., Zarate, C. A., Schwarcz, R., & Gould, T. D. (2015). The prodrug 4-chlorokynurenine

causes ketamine-like antidepressant effects, but not side effects, by NMDA/glycineB-site inhibition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(1), 76–85.

<https://doi.org/10.1124/jpet.115.225664>

Zarate, C. A., Brutsche, N. E., Ibrahim, L., Franco-Chaves, J., Diazgranados, N., Cravchik, A., Selter, J., Marquardt, C. A., Liberty, V., & Luckenbaugh, D. A. (2012). Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: A randomized controlled add-on trial. *Biological Psychiatry*, 71(11), 939–946.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.12.010>

Zarate, C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Dennis, M. ;, Charney, S., & Manji, H. K. (2006). *A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression*. 856–864.

ANEXOS

CÓPIA – Aprovação da CEUA para o uso de animais não-humanos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru



Faculdade de Ciências

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos da Quetamina sobre o aprendizado de reforçadores condicionados e modulação de seu efeito reforçador**", registrada com o nº **1045/2021 Vol. 1**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. FÁBIO LEYSER GONÇALVES - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE **ANIMAIS** (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 05/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 15/03/2022 a 01/07/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	97
Peso/Idade	300g/60 dias
Sexo	Macho
Origem	ICB-USP


Profª Associada Sandra Lia do Amaral Cardoso
Coordenadora da CEUA