UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

SARA TAMIRIS CIRILO FERNANDES

Escolha entre alternativas probabilísticas em ratos Wistars (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo

Ribeirão Preto – SP

2020

SARA TAMIRIS CIRILO FERNANDES

Escolha entre alternativas probabilísticas em ratos Wistars (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Andréia Schmidt

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Sérgio Zucoloto.

Ribeirão Preto – SP

2020

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cirilo, S. T.

Escolha entre alternativas probabilísticas em ratos Wistars (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo. Ribeirão Preto, 2020.

110 p.: 14 il.; 30 cm

Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Schmidt, Andréia.

1. Comportamento de escolha. 2. Ratos Wistar. 3. Diferenças entre machos fêmeas. 4. Ciclo reprodutivo. 5. Ciclo estral. 6. Privação alimentar.

Nome: Sara Tamiris Cirilo Fernandes

Título: Escolha entre alternativas probabilísticas em ratos Wistars (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: _____ /_____ / 2020

Banca Examinadora

Profª. Dra. Andréia Schmidt (orientadora)

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Andrés Manuel Pérez-Acosta

Instituição: Universidade do Rosário

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra. Patrícia Ferreira Monticelli

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcus Bentes de Carvalho Neto

Instituição: Universidade Federal do Pará

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por sempre compartilharem cada conquista de minha vida, e por incentivarem todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todos os caminhos percorridos.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Andréia Schmidt**, pela oportunidade de estudar comportamento, por ter me ensinado desde a época da Iniciação Científica a importância do trabalho com modelo animal, pela dedicação nas correções dos trabalhos, pela motivação quando tive que fazer coletas em outros laboratórios, por confiar no meu trabalho e contribuir tanto para o meu crescimento como pesquisadora, como, também, docente.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Fernando Sérgio Zucoloto**, por toda contribuição relacionada aos aspectos evolutivos do comportamento alimentar, pelo apoio e motivação durante a pós-graduação, pelas longas discussões nas supervisões e também por e-mail, além de todo incentivo para o meu desenvolvimento como pesquisadora e docente.

Ao meu marido, **Luis Guilherme Fernandes**¸ por todo apoio e compreensão durante a pós-graduação, pelo companheirismo nos finais de semana no laboratório, por me incentivar a cada passo que dou, pelo carinho e cuidado constante.

Aos meus irmãos, **Bruno Donizete Cirilo e José Vitor Cirilo**, pelo companheirismo em todos os momentos, pelos vários momentos de risada e pelo carinho**.**

Aos colegas de laboratório, **Claudia Bettio** pela amizade, pelas longas conversas, desabafos, pelas risadas e almoços. **Ana Carolina Miranda**, pelas conversas sem fim e pelas risadas. **Maryam Furlam,** pelas conversas sobre plantas e pela amizade. **Maria Eliza Kusano,** pelas viagens aos congressos, pela troca de experiência sobre como a análise do comportamento contribui para diferentes áreas, pelas risadas e amizade. **Vitor Pansarim**, pelo companheirismo no trabalho com ratos, pela ajuda constante e pelas conversas sobre estatística. **Vinícius Warisaia,** por todo percurso que estivemos juntos, pela parceria desde o

início do laboratório, por dividir momentos de desespero, por toda maravalha que nos rodeava e pó de ração, assim como pelos momentos de conquista e alegria.

Às minhas amigas, **Alana Brunini e Mariana Ducatti**, por serem tão acolhedoras, por me motivarem, por compartilharem comigo cada momento da pós-graduação mesmo que a distância, e pela amizade que começou na USP, mas que ainda permanece.

À banca de qualificação, Profa. Dra. **Patrícia Ferreira Monticelli**, Profa. Dra. **Milene Cristina de Carvalho**, e Prof. Dr. **Silvio de Morato de Carvalho**, pela discussão e contribuições à pesquisa.

Aos técnicos de laboratório, **Rodrigo Mazzei e João Borin,** pelo amparo em problemas técnicos, por ajudar sempre que precisei, até mesmo no cuidado dos animais no biotério.

À secretária, **Renata del Moro**, por esclarecer dúvidas sobre as normas do programa.

Aos **meu queridos alunos,** por todo incentivo, e por serem uma das motivações para que eu estude mais e tente ser uma professora cada vez melhor.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa**.**

RESUMO

Cirilo, S. T. (2020). Escolha entre alternativas probabilísticas em ratos Wistars (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

O comportamento de escolha é entendido como a seleção de uma entre duas ou mais alternativas disponíveis, sendo controlado por múltiplas variáveis (ambientais e/ou biológicas). O objetivo desta tese foi verificar se o comportamento de escolha pode ser influenciado por variáveis biológicas - o sexo e fases do ciclo reprodutivo (gestação e lactação) - e pela privação alimentar/nutricional. Para isso foram propostos dois estudos. O Estudo 1 teve como objetivo investigar se o ponto de indiferença (IP) em uma tarefa de escolha entre alternativas probabilísticas varia em função da passagem do tempo e da fase do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar, em comparação com machos. Cinco machos, seis fêmeas controles e seis fêmeas experimentais foram expostos a um procedimento de escolha cujas alternativas (duas) variavam em relação ao número de pelotas de alimento e em sua probabilidade de entrega, determinada pelo IP. A alternativa probabilística disponibilizava três pelotas de ração, e a probabilidade de obtenção de alimento era ajustada ao longo das tentativas; a outra alternativa disponibilizava duas pelotas com 100% de probabilidade de obter o reforço. Depois de estabelecido o IP as fêmeas experimentais passaram pela gestação e lactação. Não foram encontradas diferenças significativas no ponto de indiferença entre os grupos, nem entre as fases do ciclo reprodutivo. Em condições ideais de alimentação, machos e fêmeas mantiveram o mesmo ponto de indiferença (cerca de 50%) entre as alternativas ao longo do tempo. A gestação e a lactação parecem não influenciar a propensão ou aversão ao risco na escolha dos animais em condições ideais de alimentação. O objetivo do Estudo 2 foi investigar se o IP em uma tarefa de escolha probabilística varia ao longo das fases do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controle. Seis fêmeas controles e oito fêmeas experimentais (mantidas a 75% do peso *ad libitum*) foram expostas a um procedimento de escolha com duas alternativas que variavam em relação ao número de pelotas de alimento e em sua probabilidade de entrega, determinada pelo IP. O mesmo procedimento experimental do Estudo 1 foi realizado no Estudo 2. Parte das fêmeas do grupo experimental não engravidou. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao IP, nem em relação às fases do ciclo reprodutivos e nem em relação à condição de privação alimentar. Tanto as fêmeas controle quanto as fêmeas do grupo experimental mantiveram o mesmo ponto de indiferença (cerca de 50%) entre as alternativas ao longo do tempo. A gestação e a lactação parecem não influenciar a propensão ou aversão ao risco na escolha dos animais, mesmo quando as condições de alimentação não eram ideais.

Palavras-chave: Comportamento de escolha; ponto de indiferença; diferenças entre machos e fêmeas; privação alimentar; ratos.

ABSTRACT

Cirilo, S. T. (2020). C*hoice from probabilistic alternatives of Wistar rats (Rattus norvegicus) in different phases of reproductive cycles* (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

Choice behavior consists of a selection of one among two or more available alternatives, which is influenced by multiple environmental and/or biological variables. The aim of this thesis was to verify whether choice behavior can be influenced by biological variables such as sex and phases of the reproductive cycle (pregnancy and lactation), and by food/nutritional deprivation. Two studies were proposed. Study 1 aimed to investigate whether the indifference point (IP) in a choice task between probabilistic alternatives varies with the passage of time and reproductive cycles of female Wistar rats in comparison to males of the same species. Six experimental females, six control females and five control males were exposed to a choice procedure whose alternatives (two) varied in relation to the number of food pellets and their probability of delivery, determined by the IP. The probabilistic alternative provided three food pellets and the probability of obtaining food was adjusted over the trials; the other alternative provided two pellets with a 100% probability of obtaining reinforcement. After establishing the IP, the experimental females went through gestation and lactation. We found no significant differences in IP between groups and between reproductive phases. In ideal feeding conditions, males and females maintained the same IP (about 50%) between the alternatives throughout time. Gestation and lactation do not seem to influence risk taking propensity or aversion to the animals' choice under ideal nutritional conditions. The aim of Study 2 was to investigate whether the IP in a probabilistic choice task varies over the stages of the reproductive cycle of female Wistar rats submitted to a procedure of food deprivation in comparison to control females. Eight experimental females (maintained at 75% of the weight ad libitum) and six control females were submitted to a choice procedure with two alternatives that varied in relation to the number of food pellets and their probability of delivery, determined by the IP. The animals underwent the same experimental procedure performed in Study 1. Some of the females in the experimental group did not get pregnant. No significant differences were found between the groups in the indifference point through phases of the reproductive cycle and food deprivation condition. Both control and experimental females maintained the same indifference point (about 50%) between alternatives over time. Pregnancy and lactation did not seem to influence risk propensity or aversion to the animals' choice, even when feeding conditions were not ideal.

Keywords: Choice behavior; indifference point; differences between male and female rats; deprivation food; rats.

LISTA DE FIGURAS

Estudo 1

Figura 1.1 Fotos do esfregaço vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral. (A) Proestro; (B) Estro; (C) Diestro 1; (D) Diestro 2. Objetiva 10..... 39

Figura 1.2 Fotos do esfregaço vaginal de ratas contendo espermatozoides. Objetiva 10 39

Figura 1.3 Labirinto em U usado no experimento. As medidas são mostradas em centímetros..... 41

Figure 1.4 Número médio de sessões para alcançar o ponto de indiferença no grupo de machos (M), fêmeas experimentais (EF) e fêmeas controle (CF). Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para o grupo de fêmeas e n=5 para o grupo de machos..... 46

Figure 1.5 Média da probabilidade de reforçamento na alternativa maior e com risco (LR – ponto de indiferença) para machos (M), fêmeas controle (CF), e fêmeas experimentais (EF), com base no ciclo reprodutivo faz fêmeas experimentais. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos..... 47

Figura 1.6 Probabilidade média programada de reforço na alternativa LR como função do ponto de indiferença estabelecido pelo animais (IP), e a probabilidade real experienciada (Exp) pelos animais do grupo de Machos (M), Fêmeas Controle (CF) e Fêmeas experimentais (EF). Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos..... 49

Figura 1.7 Probabilidade experienciada em função da probabilidade programada na alternativa LR quando o IP foi estabelecido, em cada fase do ciclo reprodutivo, por machos (M), fêmeas controle (CF) e fêmeas experimentais (EF). A linha sólida representa os pontos em que os valores do eixo x e y coincidem..... 51

Figura 1.8 Número médio de pelotas de ração programadas para serem liberadas (Potencial) na alternativa LR e efetivamente recebidas (Recebidas) pelo grupo de machos (M), fêmeas controle (CF) e experimentais (EF), nas três últimas sessões de cada fases do ciclo reprodutivo. As barras cinza indicam a quantidade de pelotas programadas que os animais receberiam, caso escolhessem LR em aproximadamente metade das tentativas. As barras brancas indicam quantas pelotas os animais

efetivamente receberam ao escolher LR. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos..... 53

Estudo 2

Figure 2.1 Peso das fêmeas do grupo controle (CF), grupo experimental (EF) e fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP), nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para o grupo CF, n=4 para o grupo de EF e n=4 para o grupo de EF-NP..... 77

Figure 2.2 Média do número de sessões para alcançar o ponto de indiferença ao comparar o grupo de fêmeas controle (CF) e fêmeas experimentais (EF + EF-NP) – barras à esquerda da linha pontilhada, e ao comparar o grupo de fêmeas experimentais que engravidaram (EF) e as que não engravidaram (EF-NP) – barras à direita da linha pontilhada. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para o grupo de fêmeas controle e n=8 para o grupo de fêmeas experimentais..... 80

Figura 2.3 Média da probabilidade de reforçamento na alternativa com maior quantidade de alimento e com risco (LR) no ponto de indiferença para fêmeas controle (CF), fêmeas experimentais (EF), e fêmeas do grupo experimental que não engravidaram (EF-NP). Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles, n=4 para o grupo de fêmeas experimentais e n=4 para fêmeas experimentais que não engravidaram..... 81

Figura 2.4. Probabilidade média de reforço programada na alternativa LR quando o ponto de indiferença foi estabelecido (IP), e a probabilidade real experienciada (Exp) pelos animais do grupo de Fêmeas Controle (CF), Fêmeas experimentais (EF), e Fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP), ao longo de todo o estudo. Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles e n=4 para o grupo de fêmeas experimentais e fêmeas não grávidas..... 83

Figura 2.5 Probabilidade experienciada em função da probabilidade programada em LR estabelecida em cada fase do ciclo reprodutivo, fêmeas controle (CF), fêmeas experimentais (EF) e fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP). A linha sólida representa os pontos em que os valores do eixo x e y coincidem..... 85

Figura 2.6 Número médio de pelotas de ração programadas para serem liberadas (Potencial) em LR e efetivamente recebidas (Recebidas) pelo grupo de fêmeas controles (CF), experimentais (EF), e experimentais que não engravidaram (EF-NP) nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, durante as três últimas sessões de cada fase. As

barras cinzas indicam a quantidade de pelotas que os animais poderiam segundo a probabilidade programada, na alternativa LR. As barras brancas indicam quantas pelotas, no total, os animais receberam ao escolher LR. S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles e n=4 para o cada grupo de fêmeas experimentais..... 87

LISTA DE TABELAS

Estudo 2

Tabela 2. 1. Tempo de Gestação, Número de Vezes que foi Colocada Para Cruzar, Tempo que Demorou Para Engravidar e Número de Filhotes, das Fêmeas do Grupo Controle (CF) e Experimental (EF)..... 78

SUMÁRIO

Introdução..... 15
Objetivos..... 30
ESTUDO 1..... 31
Introdução..... 33
Método..... 37
Sujeito..... 37
Análise do ciclo estral, procedimento de cruzamento e redução de ninhada..... 38
Equipamento..... 40
Procedimento..... 41
Análise de dados..... 43
Resultados..... 46
Discussão..... 55
ESTUDO 2..... 63
Introdução..... 65
Método..... 71
Sujeito..... 71
Análise do ciclo estral, procedimento de cruzamento e redução de ninhada..... 72
Equipamento..... 72
Procedimento..... 73
Análise de dados..... 74
Resultados..... 77
Discussão..... 88
Referências..... 101
Anexos..... 117

Escolher é uma atividade frequente e importante para todas as espécies animais e em diferentes situações, uma vez que está relacionada à seleção de alternativas que podem promover (ou não) condições de sobrevivência e reprodução (Mazur, 1988a; Rachlin & Green, 1972). O comportamento de escolha ocorre tanto em contextos naturais, como quando o animal precisa forragear, ou mesmo escolher entre ficar parado ou movimentar-se, quanto em situações artificiais, conduzidas em laboratório (e.g., em caixas de condicionamento operante ou em labirintos) (Mazur, 2017). Escolher pode ser definido como uma resposta a uma entre duas ou mais alternativas disponíveis (Skinner, 1950) quando suas consequências são significativas para um indivíduo (Todorov & Hanna, 2007), enquanto que a preferência é definida como responder na maior parte do tempo a um dentre dois ou mais estímulos (Skinner, 1950). Em função da relevância desse tipo de situação, a literatura nesta área é bastante extensa, tanto em estudos com seres humanos, como com animais não humanos, visando, na grande maioria das vezes, identificar e descrever variáveis relacionadas com a determinação desse comportamento sob diferentes contingências de reforço (Lagorio & Madden, 2005).

Diferentes tipos de procedimentos são utilizados para estudar o comportamento de escolha, porém um dos mais comumente utilizados é o de tentativas discretas, em que o responder do organismo é restrito a momentos específicos de observação (tentativa), uma vez que a continuidade natural do comportamento é interrompida, como, por exemplo, quando o animal é retirado do equipamento experimental durante os intervalos entre tentativas ou reconduzido ao ponto inicial de um labirinto (Velasco, Garcia-Mijares, & Tomanari, 2010). Em geral, estes procedimentos estabelecem contingências de escolha em esquemas concorrentes (Catania, 1999), em que o sujeito tem diante de si duas alternativas, sendo que em cada uma delas pode estar em vigor esquemas de reforçamento diferentes ou do mesmo tipo. Por exemplo, quando os esquemas concorrentes são de intervalo variável (*conc* VI VI),

cada alternativa disponibiliza o reforçador após um tempo médio, determinado pelo esquema. Esse intervalo entre reforçadores pode ser igual nas duas alternativas, ou pode ser diferente, de modo que o sujeito é exposto simultaneamente às duas alternativas. Em outros protocolos o procedimento pode envolver situações em que o animal deve escolher entre quantidades maiores e menores de reforçador, que podem ser certos e incertos (probabilísticas), apresentados de forma imediata ou atrasada, ou situações de maior complexidade, em que os animais escolhem sem saber quais serão as consequências para suas respostas (Oliveira, Calvert, Green, & Myerson, 2013).

Uma das características do comportamento de escolha é a sua regularidade e previsibilidade, descritas a partir dos estudos com esquemas concorrentes. Herrnstein foi o primeiro autor que estudou de forma sistemática a relação entre a distribuição das respostas entre as alternativas e a distribuição dos reforçadores. Em um estudo realizado em 1961, no qual o objetivo era investigar a frequência de respostas de bicar de pombos em função da quantidade de reforço disponível em cada alternativa, Herrnstein observou que os animais apresentavam um padrão regular de distribuição de respostas entre as alternativas, igualando a distribuição de respostas com a distribuição de reforços (Todorov & Hanna, 2007). Esse estudo foi a base de sua proposta da Lei da Igualação, uma equação matemática que descreve que os organismos tendem a igualar a distribuição de respostas e a de reforçadores obtidos, maximizando, assim, a obtenção de reforçadores (Catania, 1999; Herrstein, 1970; Todorov & Hanna, 2007).

Estudos posteriores (Baum 1979; Pliskoff & Fetterman, 1981), porém, mostraram que a igualação entre as respostas apresentadas pelo organismo e os reforços obtidos nem sempre ocorre de forma exata; a partir desses estudos Baum (1974) propôs a Lei Geral da Igualação, que descreve que em alguns casos pode ocorrer, ao invés da igualação exata, o chamado *undermatching* ou *overmatching* das escolhas. No *undermatching*, a proporção de respostas é

menor que a proporção de reforços entregue em uma alternativa. Sendo assim, estabelece-se uma preferência por uma das alternativas e, portanto, o sujeito experimental não iguala suas repostas à quantidade de reforço, causando um desvio no padrão de resposta do animal. No *overmatching*, a proporção de respostas por uma alternativa é maior que a proporção de reforço entregue ao sujeito. Neste sentido, também será observada uma taxa de respostas maior que o esperado por uma alternativa (Mazur, 2017). Esses estudos têm contribuído para o entendimento das relações organismo-ambiente na análise do comportamento. Se, por um lado, a igualação inicialmente demonstrada por Herrnstein (1961) tem sido verificada em diferentes espécies, comportamentos e contextos, por outro, alguns estudos, como pontuado por Baum (1974), mostram que variáveis adicionais podem influenciar no comportamento de escolha, como a história experimental, o esquema concorrente ao qual o animal é submetido, o número de sessões, etc. Em função disso, estudos conduzidos nos últimos 30 anos têm desenvolvido novos modelos matemáticos, também tentando identificar variáveis que afetam o comportamento de escolha (Todorov & Hanna, 2007).

A forma como cada alternativa irá disponibilizar os reforçadores pode envolver probabilidade ou risco. Algumas situações de escolha que envolvem risco podem ser vistas na natureza, como quando um animal precisa escolher entre capturar uma presa disponível, mas que não satisfaz suas necessidades, ou esperar uma presa maior, mas que pode não aparecer no ambiente. Nessas situações, a alternativa que apresenta reforço sempre que acessada é chamada de alternativa sem risco ou segura, enquanto que a alternativa com consequências incertas é chamada de opção de risco (Mazur, 2004). Kacelnik e Bateson (1996) afirmam que a palavra risco pode ser usada para se referir a um perigo de predação, mas em estudos sobre comportamento de escolha/forrageamento é usada devido às variações que podem ocorrer em ambiente, por exemplo.

O padrão de escolha entre alternativas pode ser categorizado como avesso, neutro ou propenso ao risco. Um exemplo seria uma situação em que um rato precisa escolher uma entre duas alternativas disponíveis: a primeira oferece uma única pelota de ração com 100% de probabilidade de obtenção; a segunda oferece quatro pelotas, mas com 30% de probabilidade de obtenção. Se o animal escolher consistentemente a opção "segura", que oferece uma pelota de ração, diz-se que ele apresenta um padrão de escolha avesso ao risco. Se o sujeito escolher com maior frequência a opção probabilística com quatros pelotas de ração, esse padrão é categorizado como propenso ao risco. No entanto, se o animal escolher as duas opções com igual frequência, considera-se que esse padrão é neutro ao risco (Mazur, 2004).

Alguns paradigmas operantes têm sido utilizados em modelos animais desenvolvidos para que se possa estudar o desempenho de indivíduos em tarefas que exigem tolerância à incerteza e/ou a propensão ao risco. No *Iowa Gambling Task* para roedores (rIGT), por exemplo, animais precisam escolher entre alternativas vantajosas (grande chance de obter pelotas de açúcar e infrequentes pelotas de quinino – punição) ou desvantajosas a longo prazo (igual probabilidade de obter pelotas de açúcar e de quinino). Alguns autores empregam uma tarefa similar ao rIGT, chamada *Gambling Task* para roedores (rGT). Neste modelo de tarefa de escolha são disponibilizadas quatro alternativas que diferem com relação à probabilidade de obtenção de reforço, risco de punição, e a magnitude do reforço. Com a exposição às contingências os animais aprendem que uma das alternativas é mais vantajosa a longo prazo, enquanto outra é desvantajosa. Outra tarefa também empregada em estudos com roedores é a chamada Tomada de Decisão de Risco (RDT), na qual os animais precisam escolher entre duas alternativas: em uma há a oferta de um reforçador alimentar de pequena magnitude e seguro, enquanto que na outra alternativa há a disponibilização de maior quantidade de reforço alimentar, porém com probabilidade de punição (choque nas patas) (Orsini & Setlow,

2017). Finalmente, na Tarefa de Entrega Probabilística (PDT), o animal deve escolher entre alternativas com pequena ou com grande quantidade de ração, mas a alternativa com maior quantidade de alimento é probabilística, i.e, nem sempre o reforço maior estará disponível e essa probabilidade diminui ao longo do tempo. De modo geral, esses estudos consideram que o padrão de escolha é propenso ao risco quando há a preferência pela alternativa sub-ótima (a alternativa em que maior quantidade de alimento é oferecida, mas com baixa probabilidade) e escolhem a alternativa incerta quando esta não é vantajosa a longo prazo (Zoratto, Laviola, & Adriani, 2016). Esses estudos têm destacado algumas variáveis que influenciam a escolha dos animais, como a variação na quantidade de alimento obtido em cada uma das alternativas, o valor do atraso para a obtenção do reforço, risco de punição explícita, e consequências de escolha incertas (escolhas probabilísticas) (Mazur, 1988a; Rachlin & Green, 1972). A diversidade de metodologias adotadas, porém, dificulta a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos, o que tem aberto diferentes linhas de investigação e, por vezes, resultados discrepantes.

Mazur (1988a) conduziu uma pesquisa que buscou investigar parâmetros para entender o padrão de escolhas em diferentes situações de risco, que variou sistematicamente a proporção e a probabilidade de obtenção de reforço entre duas alternativas. Na pesquisa, realizada com ratos machos, a quantidade de pelotas de alimento disponibilizada em cada alternativa (1*vs*.1, 1*vs*.2, 1*vs*.4, 2*vs*.4, 4*vs*.4 e 4*vs*.8) e a probabilidade de obtenção do reforço (entre 20% e 100%) variou entre as alternativas. Uma das conclusões do estudo é que as escolhas dos sujeitos foram mais sensíveis à quantidade de reforço disponível nas alternativas do que à probabilidade com que elas eram entregues. Quando a porção de ração entregue nas alternativas era 1 *vs.* 2, por exemplo, os animais tendiam a serem mais propensos ao risco (escolhiam com maior frequência a alternativa probabilística que disponibilizava maior quantidade de alimento). Diferentemente, quando a quantidade de ração nas duas alternativas

aumentava, observou-se uma diminuição da propensão ao risco. A aversão ao risco foi predominante quando nas alternativas a proporção de ração disponível era 4 *vs*. 8, e os animais preferiam a alternativa com menor quantidade de pelotas, mas liberada em 100% das tentativas. O autor ressalta que, tanto na proporção 1*vs*. 2, quanto na proporção 4 *vs*. 8, a alternativa probabilística apresentava o dobro de ração em comparação à alternativa segura; no entanto, enquanto a primeira combinação gerava padrões de propensão ao risco, a segunda gerava padrões de aversão ao risco. Esses dados sugerem que a magnitude do reforçador disponível na alternativa segura pode influenciar fortemente a escolha de um indivíduo. Isso ocorre apenas quando a escolha pela alternativa com reforçador de maior magnitude envolve riscos e em comparação com a disponibilidade de reforço da outra alternativa e quando a alternativa segura oferece uma quantidade de alimento capaz de suprir as necessidades do animal (nesse caso, não faz sentido escolher uma alternativa probabilística).

A variável "magnitude de reforçamento" refere-se a parâmetros relacionados a pesos ou tamanhos, números de unidades de pesos ou tamanhos iguais, duração de exposição, tempo de acesso ou concentração de um nutriente (Hanna & Ribeiro, 2005). O efeito da magnitude do reforçamento foi discutido em uma revisão sobre tomada de decisão de forrageamento por aves (*Selasphorus rufus* e *Sturnus vulgaris)* realizada por Bateson (2002b). A pesquisadora mostrou que as escolhas podem ser afetadas pela variação e/ou sensibilidade ao risco em relação aos lucros (reforçadores) obtidos. A sensibilidade ao risco pode ser observada quando um animal é exposto a escolhas simultâneas de forrageamento, em que em uma das opções, chamada de "constante", o pássaro pode aprender quanto de alimento e quanto tempo levará para sua obtenção; na opção chamada de "variável", a quantidade de alimento e/ ou o atraso associado à sua obtenção é probabilística. Nesses casos, a variabilidade, a magnitude e a direção da sensibilidade ao risco são influenciadas pelo tamanho do conjunto de escolhas, pois quando ocorre a variação na quantidade de alimento

disponível, os animais tendem a apresentar maior aversão ao risco; porém, quando a variação está relacionada ao atraso para a obtenção do alimento, as aves (beija-flores e estorninhos europeus) seriam quase universalmente propensas ao risco (Bateson, 2002b; Bateson, Healy, & Hurly, 2002). A teoria da sensibilidade ao risco de forrageamento mostra que, com a pressão causada pela evolução, aves tenderam a selecionar a opção segura (constante) quando a comida é abundante, mas selecionam a opção de risco (variável) quando há escassez de alimentos, o que parece de acordo com o proposto por Mazur (2004).

O atraso para a obtenção do reforço também tem sido uma variável consistentemente estudada em experimentos sobre comportamento de escolha envolvendo risco. Nesse caso, os animais precisam escolher entre uma alternativa que oferece uma porção menor de ração entregue de forma imediata ou uma alternativa que oferece uma maior porção de ração, mas com atraso. Experimentos nessa área avaliam o chamado autocontrole. De acordo com Rachlin (1974), o autocontrole se caracteriza como a escolha consistente de um reforço maior no futuro contra um reforço menor no presente, sendo que estas alternativas diferem entre si quanto ao atraso e à magnitude do estímulo reforçador. O atraso de reforço pode ser entendido como o intervalo de tempo entre a emissão da resposta e a obtenção do reforçador; portanto, procedimentos que estudam a influência do atraso do reforço no comportamento de escolha e no autocontrole utilizam procedimentos que variam o período de atraso entre a resposta e o acesso/obtenção do reforçador (Hanna & Ribeiro, 2005). Um dos primeiros estudos com esse modelo e que serve como exemplo foi o realizado por Rachlin e Green (1972). Os autores propuseram o estudo do autocontrole em uma contingência de compromisso (*commitment*). Para tanto, investigaram a preferência de pombos diante de duas situações: ter acesso ao alimento por um curto período de tempo, mas imediatamente após a emissão da resposta ou, alternativamente, ter acesso ao alimento por um tempo significativamente maior, mas após um atraso depois da emissão da resposta. A escolha

chamada pelos autores como de “compromisso” ocorria antes da exposição às duas situações descritas: eles poderiam ter acesso apenas à alternativa com atraso, mais vantajosa (o compromisso) ou acesso às duas alternativas (alternativa SS – smaller, sooner, ou seja, menor e imediata; e alternativa LL – larger, later, ou seja, maior e atrasada). No entanto, o acesso a qualquer uma das alternativas era precedido por um tempo de espera (T). A preferência dos sujeitos variou em função do tempo de espera: quanto maior a duração de T, mais frequente a resposta de compromisso do animal, i.e., os sujeitos preferiam esperar mais e receber uma quantidade maior de comida, do que receber pequenas quantidades de alimento, porém apresentadas várias vezes e com um intervalo de espera pequeno.

Outra forma de investigar o comportamento de escolha são os modelos de escolha intertemporal, que consistem na manipulação de diferentes magnitudes de reforço, e expor o animal a uma tarefa que consiste em escolher uma pequena quantidade de reforço após um pequeno atraso, ou uma quantidade maior de reforço após um atraso longo (Perry, Nelson, & Carroll, 2008). Este tipo de experimento também oferece uma medida de impulsividade, uma vez que avalia quanto tempo o animal está disposto a esperar para obter a maior quantidade de reforço (Orsini & Setlow, 2017). Além disso, avalia o chamado *discounting* temporal, que pode ser entendido como o quanto o atraso diminui o valor subjetivo do reforçador maior, igualando o valor do reforço de maior magnitude ao reforço entregue na alternativa imediata ou com menor atraso (Oliveira, Calvert, Green, & Myerson 2013; Orsini & Setlow, 2017). O desconto temporal tem sido extensivamente investigado em humanos e animais não humanos (Zoratto et al., 2016). Por exemplo, quando um animal tem diante de si uma alternativa com três pelotas de ração entregues de forma imediata, e outra com seis pelotas de ração entregues de forma atrasada, o atraso na alternativa faz com que a maior quantidade de pelotas tenha o seu valor subjetivo diminuído; consequentemente, a depender do atraso, as seis pelotas

passam a ter o mesmo valor que as três pelotas disponíveis de forma imediata para o sujeito experimental.

Os modelos de escolha intertemporal utilizam procedimentos de ajuste no atraso (Mazur, 1987). Este procedimento faz com que o atraso para a entrega do reforço menor seja ajustado até que a escolha desta alternativa tenha a mesma frequência da escolha da alternativa com maior quantidade de reforço. Quando a escolha por ambas as alternativas se iguala, diz-se que a escolha atingiu o ponto de indiferença (IP), uma vez que a efetividade do reforçador da alternativa com menor porção de ração, apresentado após um curto atraso, e o reforço maior, apresentado depois um atraso maior, são equivalentes. Ho, Wogar, Bradshaw e Szabadi (1997) realizaram um experimento com dois grupos de ratos, sendo que cada grupo tinha um nível de privação alimentar diferente (90% e 80% do peso *ad lib.*). Os sujeitos foram expostos a uma tarefa de escolha com duas alternativas, uma com pequena quantidade de reforço entregue com atraso menor e outra com uma porção maior de ração, mas entregue após um atraso mais longo. Os autores tinham como objetivo testar o procedimento de ajuste de atraso de Mazur (1987). Os pesquisadores concluíram que, assim como apontado por Mazur e por outros autores, a escolha entre alternativas que diferem quanto à magnitude e ao atraso são influenciadas pelo atraso em vigor nas alternativas. Na tarefa estudada, quando a magnitude do reforçador nas alternativas era constante, um aumento no atraso para obtenção do reforçador menor resultou em uma mudança no valor do reforço da alternativa com maior porção de ração. O valor do reforço foi maior para o grupo mantido à 80% do peso, do que no grupo mantido à 90%. Porém quando o atraso no reforçador menor aumentou, o valor do reforço maior aumentou para ambos os grupos, mostrando que o nível de privação dos animais não foi uma variável relevante no desconto e na determinação do ponto de indiferença nesta condição.

Poucos estudos tentam verificar, por exemplo, apenas o desconto probabilístico (sem utilizar atraso para obtenção do reforço) e relacioná-lo com o comportamento de escolha (Ohmura, Takahashi, & Kitamura, 2005; Wilhelm & Mitchell, 2008). Zoratto et al. (2016), por exemplo, realizaram um estudo com o objetivo de verificar o efeito de diferentes magnitudes de reforço (e de diferentes proporções de reforço entre as alternativas segura e probabilística) no comportamento de escolha de ratos em uma tarefa de PDT. Os autores verificaram que, quando a alternativa probabilística era cinco vezes maior que a segura (1 *vs*.5 pelotas), os animais escolhiam consistentemente a alternativa probabilística independentemente da probabilidade em vigor. Porém, quando a alternativa probabilística era três vezes maior que a segura (2 *vs*. 6 pelotas), os animais tendiam a mudar a sua preferência da alternativa probabilística para a alternativa segura, conforme a probabilidade em vigor na alternativa probabilística diminuía. Esse estudo sugere que a sensibilidade dos animais à probabilidade para obtenção do reforçador de maior magnitude é influenciada pela proporção do reforço entre as alternativas, como já apontado por Mazur em 1988.

De modo geral, os estudos sobre escolha até aqui descritos têm mostrado que esse comportamento pode ser influenciado por diferentes variáveis, como a magnitude do reforçador (a quantidade de ração em cada uma das alternativas pode determinar se o padrão de escolhas será de propensão ou aversão ao risco); a probabilidade para ter acesso ao reforçador (quanto menor a probabilidade de obtenção do alimento, maiores as chances do padrão de escolha ser de aversão ao risco); o tempo de atraso para ter acesso ao reforço (quanto maior o atraso, maior a aversão ao risco); e o risco de punição explícita (a chance de obtenção de choque na alternativa com maior magnitude de reforço, por exemplo, pode determinar a aversão ou propensão ao risco).

Além dessas variáveis, alguns estudos se dedicam a estudar o papel de variáveis biológicas na aversão ou propensão ao risco. Três variáveis estudadas são a privação

alimentar, o sexo do animal, e a fase do ciclo reprodutivo, no caso de fêmeas. Vários estudos têm sido desenvolvidos para elucidar esses aspectos envolvidos no comportamento de escolha, como será visto a seguir.

A privação alimentar tem sido extensamente estudada por pesquisadores, para verificar seus efeitos no desempenho de animais em diferentes tarefas que podem envolver aprendizagem, memória e atenção, por exemplo (e.g., Finger et al. 1986; Morgane et al., 2002; Reyes-Castro et al., 2011; Valadares et al., 2010). Muitos desses estudos são realizados com o intuito de verificar os efeitos da desnutrição pré e pós-natal sobre aspectos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (Barbosa et al., 2015; Rocinhole, Almeida & De- Oliveira, 1997; Schweigert, Souza, & Perry, 2009). Além disso, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de verificar de que maneira a privação alimentar pode influenciar o comportamento de escolha, sobretudo em tarefas envolvendo risco ou escolhas probabilísticas.

Ostaszewski et al. (2003), por exemplo, demonstraram que ratos idosos expostos a procedimentos de restrição alimentar, aumentaram a taxa de desconto quando comparados a ratos jovens nas mesmas condições. Logue e Peña-Correal (1985), realizaram dois experimentos para verificar o efeito da privação alimentar no comportamento de escolha de pombos. No primeiro experimento os animais foram mantidos a 65%, 80% e 90% do seu peso *ad lib.* Os autores observaram que, nestas condições, o nível de privação alimentar não influenciou a escolha dos animais, mas a taxa de respostas (número de bicadas na alternativa que entregava reforço maior e atrasado) aumentou conforme o nível de privação aumentava. Esses dados mostram que o nível de privação pode influenciar diferencialmente o responder dos animais em tarefas de escolha, a depender do tipo de tarefa e da idade dos animais.

Diferenças entre machos e fêmeas também têm sido estudadas a partir de diferentes tarefas (aprendizagem, memória, escolha, etc.). A variável sexo parece ter influência no

desempenho dos animais em diferentes tarefas em função dos diferentes papéis desempenhados por machos e fêmeas na natureza, e também em função de variações hormonais que são registradas principalmente em fêmeas (Lovick, 2014; Orsini et al., 2016; Prendergast, Onishi, & Zucker, 2014; Rajab et al. 2014).

Alguns fatores contribuem para a propagação da espécie como a fertilidade e fecundidade das fêmeas. O comportamento reprodutivo, controlado pelo hipotálamo, é regulado por hormônios lançados na circulação sanguínea pelas glândulas sexuais e pela adenoipófise. Esta última secreta duas gonodotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Em fêmeas, o FSH estimula o crescimento e maturação dos folículos ovarianos, enquanto que o LH está relacionado com a ovulação e formação do corpo lúteo. Outros hormônios envolvidos no comportamento sexual são o estrogênio e a progesterona, que são produzidos ciclicamente e regulados pelos ovários. Estes hormônios são importantes para a preparação do trato reprodutivo da fêmea para a recepção do óvulo fertilizado (Brandão, 2004).

A fertilização do óvulo só ocorrerá se a fêmea entrar no período de ovulação, caracterizado pela receptividade sexual (cio) e pelo estro (Freeman et al., 1994). Em ratas a ovulação é cíclica e espontânea, e independente de alterações sazonais ou de atividade sexual. O ciclo completo pode ocorrer no período de 4 a 5 dias e é dividido em quatro fases: Proestro, Estro, Diestro 1 e Diestro 2. Cada uma das fases do ciclo estral da rata apresenta diferentes durações: o Proestro dura em torno de 12 a 14 horas; em seguida, é iniciado o Estro, que pode durar entre 25 e 27 horas; o Diestro 1 dura em torno de 6 a 8 horas; e, por fim, o Diestro 2, tem duração de 55 a 57 horas (Butcher, Collins & Fugo, 1974; Long & vans, 1922).

A identificação da fase do ciclo das ratas pode ser feita a partir da análise de células coletadas por meio de esfregaço vaginal. De modo geral, três tipos de células podem ser

observados: redondas e nucleadas, que são conhecidas como células epiteliais; irregulares e sem núcleo, que são as células cornificadas; e pequenas e redondas, que são os leucócitos. Para determinar a fase do ciclo estral em que o animal se encontra, leva-se em consideração a proporção das células encontradas na secreção vaginal. No Proestro deverá haver maior proporção de células epiteliais nucleadas; no Estro, maior quantidade de células epiteliais cornificadas; no Diestro 1, maior proporção de células epiteliais cornificadas e leucócitos; por fim, no Diestro 2, deve haver menor proporção de células epiteliais nucleadas e maior proporção de leucócitos (Marcondes, Bianchi & Tanno, 2002; Orsini et al., 2016).

O período de receptividade das fêmeas ocorre na fase escura do dia, durante o estro, mas elas também podem ficar receptivas ao macho no final da fase de proestro (Goldman et al., 2007; Hebel & Stromberg, 1986). Se durante esta fase a rata acasalar com o macho, e houver presença de espermatozoide nas lâminas com esfregaço vaginal, considera-se que o animal entrou no período de gestação (Azeredo et al., 2003; De Mello, Luciano, & Correa, 2002). O período de gestação dura em torno de 21 dias, período em que há crescimento corporal e aumento de ingestão alimentar (Santos, 2002). Encerrada essa fase, inicia-se o período de lactação, em que as fêmeas são mantidas com seus filhotes por 21 dias, para que contribuam com seu desenvolvimento (Eliasson & Meyerson, 1975). Para o filhote se desenvolver é importante que a mãe estimule as regiões genitais, os olhos e orelhas, além de amamenta-los (Santos, 2002; Vieira, 2003). Durante essa fase, há uma perda no peso da rata, seguido de um aumento ainda maior na ingestão alimentar (Dial & Avery, 1991).

Embora as fêmeas apresentem todas essas alterações hormonais, nos machos alguns hormônios também são importantes para o controle do comportamento sexual: o FSH irá estimular a germinação dos testículos, e o LH ativa as células de Lyding. Estas células são secretoras de andrógenos do tecido intersticial dos testículos, produzindo, então, testosterona (Brandão, 2004). Essas diferenças hormonais indicam a importância de se estudar as

diferenças entre machos e fêmeas, tanto em pesquisas que enfatizam aspectos fisiológicos, como também em estudos que investigam alterações comportamentais. Beery e Zucker (2011) realizaram um trabalho de revisão de estudos com animais não humanos, com a finalidade de investigar a porcentagem de estudos que envolviam fêmeas, e verificaram que a grande maioria dos artigos revisados utilizavam apenas machos. Prendergast et al. (2014) também chamam a atenção para o pouco uso de fêmeas em pesquisas, destacando a importância e a necessidade de estudos que utilizem animais de ambos os sexos.

Estudos sobre comportamento de escolha têm apontado diferenças entre machos e fêmeas sob certas condições (Haaren, Hest, & Poll, 1988; Koot et al., 2009; Orsini et al., 2016; van den Bos et al., 2012). Koot et al. (2009), por exemplo, investigaram a impulsividade de machos e fêmeas submetidos a diferentes níveis de restrição alimentar, em uma tarefa de escolha. Os pesquisadores dividiram machos e fêmeas em dois grupos: o "*steep*", composto por machos e fêmeas que diminuíram a porcentagem de escolhas pela alternativa que tinha maior porção de ração, mas entregue com atraso (LL); e o "*flat*", composto de machos e fêmeas que escolhiam com maior frequência a alternativa LL. Ao comparar os dados de machos e fêmeas "*steep*" observou-se que as fêmeas diminuíram suas escolhas por LL quando o atraso nessa alternativa aumentava, mas não chegavam a estabelecer preferência pela alternativa com menor porção e sem atraso (SS). Os autores concluíram que as fêmeas tenderam a ser mais sensíveis ao aumento do atraso na alternativa LL, sendo, portanto, avessas ao risco. Lukkes, Thompson, Freund e Andersen (2016), realizaram uma pesquisa com o objetivo de verificar diferenças no comportamento de escolha em ratos machos e fêmeas com diferentes idades. Os autores verificaram que ratas jovens apresentaram baixo nível de impulsividade se comparadas a ratos machos na mesma idade, escolhendo com maior frequência a alternativa LL. Ao longo do tempo essa impulsividade tendeu a ser maior, quando as ratas eram "adolescentes" e adultas. Aparentemente, esses

resultados sugerem que as fêmeas apresentam uma sensibilidade diferente dos machos quando precisam escolher entre alternativas que apresentam diferentes magnitudes de reforço e atrasos para sua obtenção.

Diferenças entre machos e fêmeas têm sido encontradas em outros estudos que expõem animais a tarefas de aprendizagem, memória, comportamento alimentar e desamparo aprendido (Gouveia Jr. & Morato, 2002; Rajab et al., 2014; Shibatta & Rocha, 2001). O número desses estudos, porém, é reduzido, dificultando um panorama mais amplo sobre eventuais diferenças relacionadas ao sexo e confirmando a necessidade de estudos que incluam animais de ambos os sexos (Beery & Zucker, 2011; Prendergast et al., 2014).

Estudos sobre o comportamento de fêmeas em diferentes fases do ciclo reprodutivo são ainda mais raros. Os mais antigos (e.g., Richter & Barelare, 1938) referem-se ao consumo de diferentes tipos de nutrientes em diferentes fases do ciclo reprodutivo, em tarefas de *self-selection*. Os autores verificaram que o consumo de nutrientes variava em função do período em que a fêmea se encontrava (antes de engravidar, durante a gravidez, lactação ou pós-lactação), demonstrando a sua sensibilidade em relação às próprias necessidades nutricionais. Em um estudo mais recente Yang et al. (2015) verificaram que fêmeas reagiam diferencialmente a filhotes verdadeiros e modelos de borracha em um labirinto em cruz elevado, a depender se já tivessem tido filhotes ou não. Esses estudos indicaram que há alterações, tanto comportamentais, como fisiológicas durante o período de pré-gestação, gestação e lactação. Apesar disso, e da necessidade da inclusão de fêmeas nas pesquisas, a variável biológica relacionada ao ciclo reprodutivo ainda tem sido pouco investigada, principalmente nos experimentos envolvendo escolha. Na pesquisa realizada para essa tese não foram encontrados estudos que investigassem especificamente esse problema. Portanto, é importante aprofundar a investigação da interferência de variáveis em tarefas de escolha,

como complemento ao que se sabe sobre a interferência de variáveis ambientais sobre o desempenho de animais nessas tarefas.

O presente estudo é composto por dois experimentos, ambos sobre comportamento de escolha em ratos. O objetivo geral foi verificar se o comportamento de escolha pode ser influenciado pelas variáveis biológicas sexo e fases do ciclo reprodutivo (gestação e lactação), e pela privação alimentar. Os objetivos específicos de cada estudo foram:

a) Estudo 1: verificar se o ponto de indiferença em uma tarefa de escolha entre duas alternativas (uma segura, com menor magnitude de reforço, e outra probabilística, com maior magnitude de reforço) poderia variar em função da passagem do tempo e da fase do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar (sem filhotes, prenhes e em período de lactação), em comparação com machos.
b) Estudo 2: Verificar se o ponto de indiferença em uma tarefa de escolha entre duas alternativas (uma segura, com menor magnitude de reforço, e outra probabilística, com maior magnitude de reforço) poderia variar ao longo das fases do ciclo reprodutivo em um grupo de fêmeas submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controle.

ESTUDO 1

Comportamento de escolha entre alternativas probabilísticas de fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus)* em diferentes fases do ciclo reprodutivo, em comparação com machos

RESUMO

O comportamento de escolha é controlado por múltiplas variáveis, incluindo as biológicas. O objetivo deste estudo foi investigar se o ponto de indiferença (IP) em uma tarefa de escolha entre alternativas probabilísticas varia em função da passagem do tempo e da fase do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar, em comparação com machos. Foram expostos cinco machos, seis fêmeas controles e seis fêmeas experimentais a sessões em que deveriam escolher entre duas alternativas que variavam em relação ao número de pelotas de alimento e em sua probabilidade de entrega, determinada pelo IP. A alternativa probabilística disponibilizava três pelotas de ração, e a probabilidade de obtenção de alimento era ajustada ao longo das tentativas; a outra alternativa disponibilizava duas pelotas com 100% de probabilidade de obter o reforço. Despois de estabelecido o IP as fêmeas experimentais passaram pela fases de gestação e lactação. Não foram encontradas diferenças significativas no ponto de indiferença entre os grupos, nem entre as fases do ciclo reprodutivo. Em condições ideais de alimentação, machos e fêmeas mantiveram o mesmo ponto de indiferença (cerca de 50% de probabilidade na alternativa com maior quantidade de pelotas) ao longo do tempo. A gestação e a lactação parecem não influenciar a propensão ou aversão ao risco na escolha dos animais em condições ideais de alimentação.

Palavras-chave: Comportamento de escolha; gestação; lactação; escolha arriscada; ratos Wistar.

ABSTRACT

Choice behavior is influenced by multiple variables, including biological factors. The aim of this study was to investigate whether the indifference point (IP) in choice tasks between probabilistic alternatives varies with the passage of time and reproductive cycle of female Wistar rats, in comparison to males. We exposed five control males, six control females, and six experimental females to sessions in which they needed to choose between two alternatives, varying in the number of food pellets and in their probability of delivery, determined by the IP. The probabilistic alternative provided three food pellets and the probability of obtaining food was adjusted over the trials; the other alternative provided two pellets with a 100% probability of obtaining reinforcement. After establishing the IP, the experimental females went through gestation and lactation. We found no significant differences in IP between groups and between reproductive phases. In ideal feeding conditions, males and females maintained the same IP (about 50% probability in the alternative with the highest amount of pellets) throughout time. Gestation and lactation do not seem to influence risk taking propensity or aversion to the animals' choice under ideal nutritional conditions.

Keywords: Choice behavior; gestation; lactation; risky choice; Wistar rats.

Estudos envolvendo risco para obtenção de reforço sugerem que as escolhas dos sujeitos podem ser influenciadas pela quantidade de alimento disponível nas alternativas (Hastjarjo, Silberberg & Hursh, 1990; Mazur, 1988a), assim como pela probabilidade de obtenção do alimento na alternativa probabilística (Mazur, 1988a). Essas variáveis fazem com que os animais escolham com maior ou menor frequência a alternativa mais vantajosa em longo prazo.

A magnitude do reforço e a probabilidade para sua obtenção podem ser consideradas variáveis ambientais (Bateson, 2002a; Bateson, 2002b; Gilby & Wrangham, 2007; Timberlake, Gawley, & Lucas, 1987), mas é preciso considerar que o comportamento de escolha também é influenciado por variáveis biológicas, como, por exemplo, o sexo e o período reprodutivo das fêmeas (gestação e lactação). Vários estudos com ratos (*R. norvegicus*) têm investigado o papel dessas variáveis biológicas na determinação de diferentes comportamentos.

Na literatura, estudos que comparam o desempenho de fêmeas e machos em diferentes tarefas têm encontrado resultados de interesse para várias áreas: fêmeas costumam explorar mais ambientes novos em comparação aos machos (Hughes, 1968); em tarefas que testam memória e aprendizagem, machos sob restrição alimentar apresentaram desempenhos melhores no labirinto aquático de Morris, em comparação a fêmeas nas mesmas condições (Rajab et al., 2014); em tarefa de escolha envolvendo atraso para obtenção do reforço, fêmeas tenderam a estabelecer preferência entre alternativas antes que os machos (Cirilo, 2016). Esses dados mostram a importância de compreender de que forma características específicas ligadas ao sexo nas diferentes espécies podem afetar diferencialmente seus comportamentos (Beery & Zucker, 2011; Prendergast, Onishi, & Zucker, 2014).

Diferenças no desempenho de machos e fêmeas também foram encontradas em tarefas de escolha envolvendo risco, porém os resultados encontrados ainda são pouco conclusivos.

Van den Bos, Jolles, van der Knaap, Baars e Visser (2012) expuseram machos e fêmeas a uma tarefa de escolha probabilística no Iowa Gambling Task para ratos (rIGT), em que tinham à disposição uma alternativa desvantajosa no longo prazo (10% de chance de obter três pelotas de ração com açúcar e 90% de chance de receber três pelotas de quinino) e outra vantajosa no longo prazo (80% de chances de obter uma pelota de açúcar e 20% de chance de obter uma pelota de ração com quinino). Todos os animais estabeleceram preferência pela alternativa vantajosa no longo prazo, mas os machos estabeleceram essa preferência mais rapidamente. No estudo de Peak, Turner e Burne (2015), por outro lado, as fêmeas estabeleceram essa preferência mais rapidamente que machos em uma tarefa de Gambling para ratos (rGT). Apesar de ambos os estudos mostrarem que machos e fêmeas estabelecem preferência pela alternativa mais vantajosa, Orsini, Willis, Gilbert, Bizon e Setlow (2016) mostraram que, em uma situação de escolha envolvendo probabilidade de risco explícito (choque) na alternativa vantajosa (com maior porção de alimento), as fêmeas preferem a alternativa menos vantajosa e sem punição, diferentemente dos machos. Essas diferenças entre machos e fêmeas ressaltam que o sexo pode ser uma variável relevante que afeta o comportamento de escolha em situações envolvendo risco, sendo necessários mais estudos.

Existem algumas evidências de que as diferentes fases do ciclo estral influenciam o comportamento de ratas em contingências experimentais relacionadas ao comportamento de medo (Lovick, 2014; Milad, Lebron-Milad, & Novaes, 2009) e ansiedade (Devall, Santos, & Lovick, 2011; Gouveia Júnior & Morato, 2002), e em tarefas de aprendizagem e memória (Andreano & Cahill, 2009). No entanto, pesquisas que controlaram o ciclo estral de ratas para verificar a sua influência no desempenho dos animais em tarefas de escolha envolvendo risco não encontraram evidências de que o ciclo estral influencia a escolha pela alternativa de risco (Orsini et al., 2016; van den Bos et al, 2012). Esses resultados sugerem que, talvez, o ciclo estral seja relevante na determinação de alguns comportamentos, mas não de outros, e ainda

se sabe pouco sobre quais seriam esses comportamentos e qual o nível de influência do ciclo estral sobre eles. Além disso, estudos que investigam a influência de fatores hormonais sobre o comportamento têm investigado muito pouco o comportamento de fêmeas ao longo do seu ciclo reprodutivo (fase pré-gestacional, gestação e lactação).

Considerando que a fase do ciclo estral pode ser uma variável relevante para alguns comportamentos de fêmeas, seria plausível supor que as fases do ciclo reprodutivo também tenham influência em seu comportamento. Ratas fêmeas gestantes e lactantes, no entanto, são utilizadas em estudos principalmente para desnutrir ninhadas e para verificar alterações fisiológicas e estruturais de fêmeas prenhes e de seus filhotes (Bauman & Currie, 1980; Ben-Jonathan, Oliver, Weiner, Mical, & Porter, 1977; Nunes, Batista, Micheli, & Batistella, 2002). Alterações comportamentais de fêmeas ao longo do ciclo reprodutivo, porém, não têm sido estudadas. Assim como o comportamento alimentar de fêmeas se ajusta às suas necessidades nutricionais a depender de seu estado de gestação, lactação e pós-lactação (Dial & Avery, 1991; Leshner, Siegel & Collier, 1972; Woodside & Millelire, 1987), pode-se supor que a propensão ou aversão ao risco, padrão de comportamento investigado em tarefas envolvendo escolhas probabilísticas, também possa se alterar a depender da fase do ciclo reprodutivo. Uma hipótese plausível é a de que durante a gravidez e a lactação as fêmeas se exponham menos ao risco do que fora desses períodos, pois isso impediria danos aos filhotes. Essa hipótese, porém, nunca foi testada.

O presente estudo aponta nessa direção, propondo a exposição de fêmeas e machos a uma tarefa de escolha probabilística ao longo de todo o ciclo reprodutivo das fêmeas: pré-gestação, gestação e lactação. Na tarefa proposta, os animais tinham duas alternativas de escolha: uma que disponibilizava duas pelotas de ração com 100% de probabilidade de obtenção (alternativa SS – *small and safe*), e outra que disponibilizava três pelotas, mas com probabilidade de obtenção (alternativa LR – *large and risky*) ajustada ao longo do

procedimento em função do ponto de indiferença (IP) entre as alternativas. O objetivo desta pesquisa foi verificar se as diferentes fases do ciclo reprodutivo das fêmeas (pré-gestação, gestação e lactação) estariam relacionadas a variações no IP de suas escolhas entre alternativas probabilísticas. Machos foram usados como controles.

Método

Sujeitos

Foram utilizados seis machos e 12 fêmeas, da espécie *R. norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 60 dias de idade. Os dados de um macho tiveram que ser descartados porque ele adoeceu durante o procedimento. Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, foram recebidos aos 21 dias de idade. Os animais ficaram alojados em duplas (machos e fêmeas separados), durante todo o período das Fases 1 e 2 do experimento, em gaiolas de polipropileno (387cm^2 de área por 17,8cm de altura), forradas com maravalha. No período de lactação, as fêmeas foram mantidas em caixas individuais com seus filhotes. A temperatura do biotério variava entre 20 e 24°C, com ciclos claro-escuro diário (12/12 h).

Durante os procedimentos experimentais a disponibilidade de ração para os animais foi controlada. Parte da porção diária foi disponibilizada durante o experimento e o restante disponibilizado na gaiola viveiro após o encerramento da sessão experimental (cerca de 1 hora após o experimento) por um período de três horas. Durante o período de alimentação os animais foram mantidos em caixas individuais para controle da ingestão. O cálculo médio de consumo da ração diária foi feito com base no controle da ingestão alimentar realizado entre os 60 e 70 dias de idade. Um ajuste na porção de ração disponível para os animais foi necessário para que as fêmeas não ficassem desnutridas durante o período de gestação e lactação. Para os machos a dieta foi aumentada em 3g de ração a cada semana, e para as fêmeas controle 2g. A quantidade média de ração das fêmeas experimentais foi calculada com base nas sessões iniciais do período de gestação, e 1g foi acrescentado a cada semana. Durante o período de lactação a ração foi oferecida *ad lib.*, durante o período de três horas por cinco dias. Foi calculada, então, a média de ingestão de ração dessas fêmeas nesse período. Após estabelecida essa média, foi acrescentado 1g de ração à porção individual a

cada dois dias. O procedimento experimental foi iniciado a partir dos 71 dias de idade. A água ficou disponível *ad lib*. para todos animais na caixa viveiro durante todo o experimento. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (protocolo 16.5.677.59.5 – Anexo A).

Análise do ciclo estral, procedimento de cruzamento e de redução de ninhadas

Nas três etapas deste estudo, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado diariamente a partir dos 60 dias de idade. A coleta do esfregaço vaginal foi feita no período entre 8 e 10 horas da manhã. A secreção vaginal foi coletada com uma alça de inoculação, que era mergulhada em água e inserida na vagina, retirando o fluído contendo células que eram espalhadas em uma lâmina. Em seguida, a lâmina era corada com corante para uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil). A lâmina corada foi analisada em um microscópio com luz, nas lentes 10 e/ou 40x. As alterações na aparência citológica foram avaliadas para definir as fases do ciclo estral: Proestro, Estro, Diestro 1 e Diestro 2 (Hubscher, Brooks, & Johnson, 2005). As fêmeas iniciaram os procedimentos experimentais somente após apresentarem um ciclo regular por um período de 10 dias.

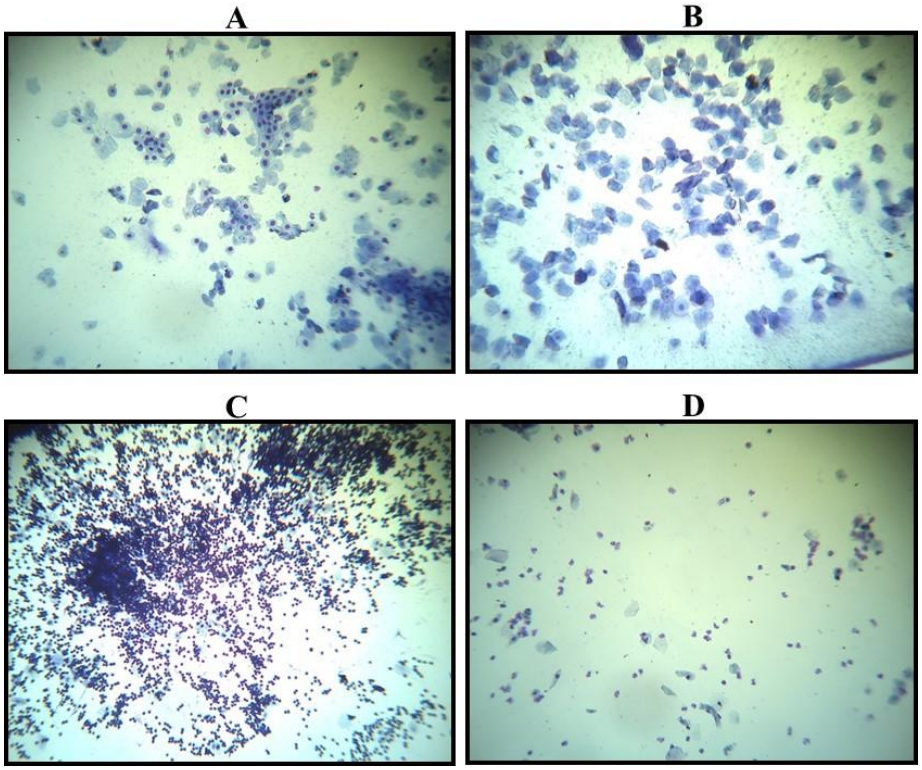

Figura 1.1. Fotos do esfregaço vaginal das fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral. (A) Proestro; (B) Estro; (C) Diestro 1; (D) Diestro 2. Objetiva 10.

O procedimento de cruzamento foi realizado somente em fêmeas que passaram pela Etapa 3 deste estudo e consistiu em colocar duas fêmeas na caixa viveiro de um macho experimentalmente ingênuo. A ocorrência de espermatozoides no esfregaço vaginal diário indicava gestação.

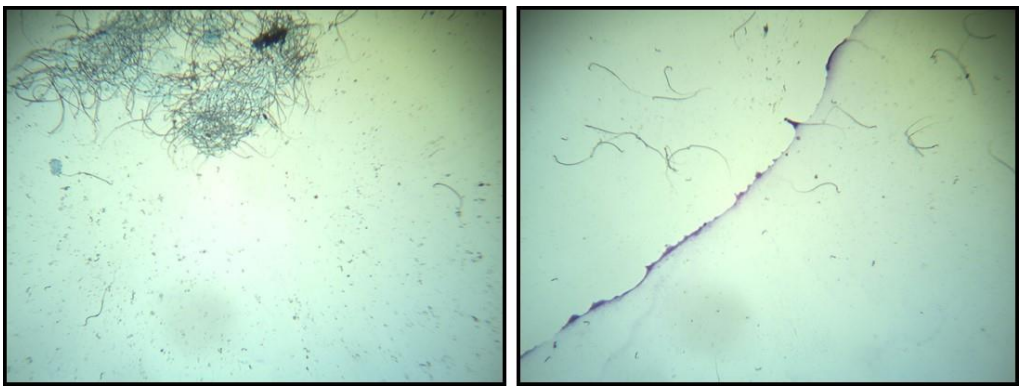

Figura 1.2. Fotos do esfregaço vaginal de ratas contendo espermatozoides. Objetiva 10.

No segundo dia de lactação, as ninhadas foram reduzidas para seis filhotes (três fêmeas e três machos), igualando a quantidade de filhotes entre as fêmeas.

Equipamento

Assim como em outros estudos (Magni, Krekule & Bures, 1979; Okaichi & Oshima, 1990; Szelest & Cohen, 2006; van den Bos et al. 2012), optou-se por utilizar um labirinto para avaliar o comportamento de escolha. Foi utilizado um labirinto em U confeccionado em acrílico (Figura 1.3). O labirinto tem um corredor inicial, com 50 cm de comprimento, ao final do qual iniciam dois braços, um à direita e outro à esquerda, formando um “U”. No corredor inicial localiza-se a porta A, opaca e de guilhotina, que dá acesso aos braços do labirinto. Os braços medem 50 cm no elo inicial (transversais ao corredor inicial), um à direita e outro à esquerda, feitos de acrílico, com paredes laterais com 50 cm de altura. Em cada braço há uma porta, B1e B2, de acrílico transparente e retrátil, que ao serem ultrapassadas não permitem que o retorne pelo braço do aparato. Ao passar por B1, o animal encontra C1, opaca e de guilhotina, possibilitando o acesso ao comedouro (4 x 6 x 1,5cm) elevado a 3 cm do chão do labirinto. Se o animal acessar B2, encontra C2 (opaca e de guilhotina), que também dá acesso ao comedouro. As sessões foram gravadas por uma filmadora SONY, modelo HDR-CX220, alocada no teto da sala experimental.

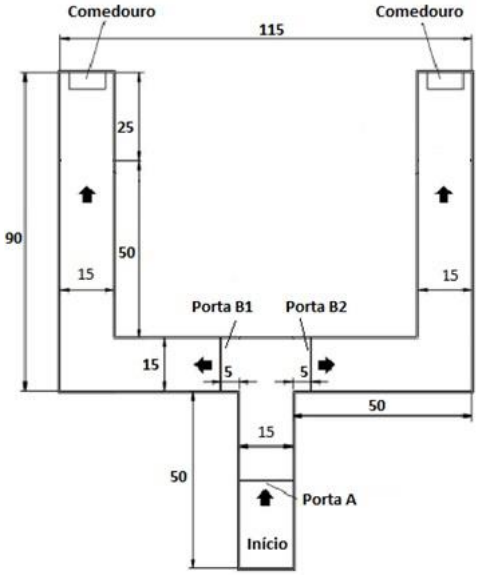

Figura 1.3. Labirinto em U usado no experimento. As medidas são mostradas em centímetros.

Procedimento

Os experimentos iniciaram-se quando os animais tinham 71 dias de idade e após as fêmeas terem um ciclo estral regular. A coleta de dados foi realizada cinco dias por semana, e durou cerca de 15 semanas, sendo a análise do ciclo estral realizada antes de cada sessão experimental. O procedimento foi dividido em três etapas:

Etapa 1 – Treino forçado. O objetivo dessa etapa foi permitir que o animal explorasse o labirinto e tivesse contato com o comedouro onde a ração era disponibilizada. Foram realizadas cinco sessões com 10 tentativas forçadas: em cinco tentativas o animal só conseguia passar pela porta B1, e nas outras cinco pela porta B2. No início de cada tentativa o sujeito foi colocado no link inicial do labirinto ("Início", na Figura 3) e a porta A foi aberta, permitindo ao animal o acesso às portas B1 e B2. Após passar pela porta B (1 ou 2), ao final do braço, o animal encontrava a porta C1 ou C2 que, ao ser aberta, dava acesso ao comedouro que continha

duas pelotas de ração no braço da esquerda (porta C1) e três pelotas de ração na porta da direita (porta C2). Para metade dos animais a alternativa com maior quantidade de ração era o braço direito, e para a outra metade era o braço esquerdo. Nesta etapa inicial o animal tinha acesso a 0,09 g de ração na alternativa com três pelotas (ao totalizar as cinco tentativas forçadas recebia 0,45 g de ração), e 0,06 g na alternativa com duas pelotas (em cinco tentativas recebia no total 0,30 g), uma vez que cada pelota pesava cerca de 0,03g. O intervalo entre as tentativas (IET) foi de 20s.

Etapa 2 – Estabelecimento do ponto de indiferença. O objetivo nesta etapa foi estabelecer o ponto de indiferença (IP) entre as alternativas para cada animal individualmente. Cada tentativa teve duração de 40s, independente da escolha do animal pela alternativa com 100% de probabilidade de obter o reforço (SS) ou pela de menor probabilidade de obter o reforço (LR). O IET foi de 20s. Cada sessão tinha, no total, 35 tentativas. Inicialmente os sujeitos foram expostos a 15 tentativas forçadas, sendo cinco no braço SS (duas pelotas de ração), e dez tentativas no braço LR (três pelotas). Foi conduzido um maior número de tentativas forçadas no braço LR para que o sujeito fosse exposto à contingência probabilística vigente naquela alternativa antes de seguir para as tentativas livres.

Encerradas as tentativas forçadas, foram realizadas 20 tentativas livres, em que o animal podia escolher o lado direito ou esquerdo (portas B1 e B2 destravadas), sem qualquer intervenção da experimentadora. A probabilidade de obtenção do reforço na alternativa LR foi de 50% nas sessões iniciais. Se o animal escolhesse mais que 60% das vezes a alternativa LR durante três sessões consecutivas, na sessão seguinte a probabilidade de obtenção de reforço nesta alternativa diminuía em 10%. Se a escolha do sujeito fosse menor que 40% na alternativa LR durante três sessões consecutivas, na sessão seguinte a probabilidade nessa

alternativa aumentava em 10%. A porcentagem aumentava ou diminuía até que a porcentagem de escolhas na alternativa LR se mantivesse entre 40 e 60% por três sessões consecutivas, sem que houvesse tendência ascendente ou descendente ao longo dessas sessões. Após estabelecido o IP, seis fêmeas, escolhidas por sorteio antes de iniciarem a Etapa1, foram colocadas para cruzar. As demais fêmeas e os machos continuaram a ser testados pelo mesmo tempo que as fêmeas que passaram pela Etapa 3, a fim de monitorar a manutenção ou não do IP entre as alternativas.

Etapa 3 – Monitoramento do ponto de indiferença entre fases do ciclo reprodutivo. O objetivo nessa etapa foi verificar se o IP entre as alternativas, verificado antes da gestação, seria mantido ou não durante o período de gestação e lactação das seis fêmeas selecionadas. Durante o período em que as fêmeas estavam alojadas junto aos machos, não passaram pelas sessões experimentais. No segundo dia de gestação iniciou-se a Etapa 3 e os mesmos procedimentos experimentais descritos na Etapa 2 foram seguidos, tanto no ajuste da probabilidade da alternativa LR quanto no monitoramento do IP. No período de lactação, a coleta de dados iniciou-se um dia após o nascimento dos filhotes. Os animais controle continuaram sendo testados nos mesmos procedimentos utilizados na Etapa 2, até a finalização do período de lactação das fêmeas experimentais.

Análise de dados

Foi calculada a probabilidade média em que o IP se estabeleceu em cada fase do experimento, que foi dividida seguindo cada etapa ciclo estral; os valores foram submetidos a uma ANOVA de medidas repetidas. O número médio de sessões para estabelecer o IP (Fase 1) foi calculado, bem como a média da probabilidade de reforçamento na alternativa LR desde de que o IP foi estabelecido (três sessões consecutivas). Todos os dados foram

submetidos inicialmente ao teste de normalidade, de homogeneidade e de esfericidade (Teste Shapiro-Wilk para normalidade, Teste de Levene para a homogeneidade e Teste de Esfericidade de Mauchly – $p > 0,05$), como requisitos para a utilização da ANOVA de medidas repetidas. Caso a esfericidade dos dados fosse rejeitada, era aplicada a correção Greenhouse-Geisser para os valores de F. A média do número de sessões para estabelecer o IP, na Fase 1 do experimento (pré-gestação das fêmeas experimentais), foi submetido ao teste Kruskal-Wallis. O tamanho do efeito foi calculado pelo Omega Squered (ω^2). Os valores de ω^2 foram classificados como trivial ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 < \omega^2 < 0.06$), médio ($0.06 < \omega^2 < 0.14$) ou grande ($\omega^2 > 0.14$). Por último a média da probabilidade de reforçamento na alternativa LR foi submetida à análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas com grupos (Macho – M, fêmeas controle – CF, e fêmeas experimentais – EF) e condições (Fase 1-pré-gestação, Fase 2-gestação e Fase 3-lactação) como fatores.

Para analisar a propensão ao risco a variável dependente foi a preferência por LR. Devido à discrepância que pode ocorrer entre a probabilidade programada pelo experimentador para ter acesso ao reforço em maior quantidade e a probabilidade realmente experienciada pelos animais (p), foi calculado o valor de “p” realmente experienciado por cada grupo. Para isso foi contabilizado o número de entradas bem-sucedidas em LR, dividido pelo número total de tentativas que o animal poderia entrar em LR em uma sessão; o valor final foi multiplicado por 100 (entradas bem-sucedidas em LR/ demanda total em LR x 100) (Zoratto, Laviola, & Adriani, 2016). Esses dados também foram submetidos ao teste de normalidade, homogeneidade e de esfericidade. A porcentagem experienciada e a média da probabilidade de reforçamento na alternativa LR foi submetida a ANOVA de duas vias de medidas repetidas com os fatores grupos (Macho – M, fêmeas controle – CF, e fêmeas experimentais – EF) e condições (Fase 1-pré-gestação, Fase 2-gestação e Fase 3-lactação). O tamanho do efeito foi calculado (ω^2). Todas as análises estatísticas foram feitas por meio do

software JASP 0.10.2.0 para Windows (Amsterdam, The Netherlands), com p-valor de <0.05 considerados estatisticamente significativos (intervalo de confiança de 95%).

Resultados

A Figura 1.4 mostra o número médio de sessões que os grupos de machos, fêmeas controle e experimentais, levaram para atingir o ponto de indiferença na Fase 1 do experimento (período estabelecido considerando o tempo de pré-gestação das fêmeas experimentais).

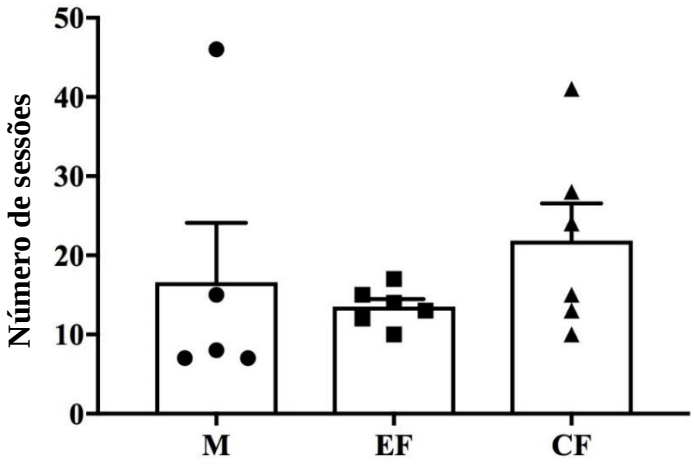

Figura 1.4. Número médio de sessões para alcançar o ponto de indiferença no grupo de machos (M), fêmeas experimentais (EF) e fêmeas controle (CF). Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos.

O teste Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos [H (2) = 2.31, p >.05]. Esses dados mostram que provavelmente a variável sexo não influenciou o número de sessões para definir o ponto de indiferença.

A probabilidade média de reforçamento na alternativa LR quando os sujeitos estabeleceram o IP durante a Fase 1, Fase 2 e Fase 3 é apresentada na Figura 1.5. Cada Fase do experimento foi dividida conforme a fase do ciclo reprodutivo (períodos de pré-gestação, gestação e lactação) das fêmeas experimentais.

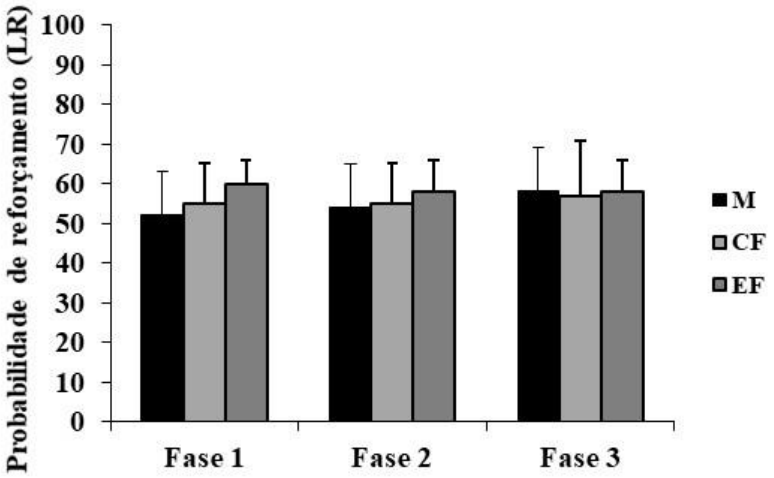

Figure 1.5. Média da probabilidade de reforçamento na alternativa maior e com risco (LR – ponto de indiferença) para machos (M), fêmeas controle (CF), e fêmeas experimentais (EF), nas diferentes fases do experimento, que foram divididas com base no ciclo reprodutivo das fêmeas experimentais. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos.

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos [$F(2, 14) = 0.301$, $p > .05$; $\omega^2 < 0{,}001$], condição [$F(2, 28) = 1.700$, $p > .05$; $\omega^2 = 0{,}004$] ou interação entre grupos e condição [$F(4, 28) = 1.600$, $p > .05$; $\omega^2 = 0{,}006$] na probabilidade em vigor na alternativa LR quando o IP foi estabelecido. No geral, o IP dos animais na alternativa LR foi estabelecido quando a probabilidade de reforço estava entre 50% e 60%, com exceção de um macho e uma fêmea controle que atingiram e mantiveram o IP quando a probabilidade em LR estava entre 70% e 80% em todas as fases do experimento. Esses dados sugerem que nem a variável sexo e nem a variável fase do ciclo reprodutivo provocou mudanças no IP ao longo do procedimento. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos [$F(1, 10) = 0.205$, $p > .05$; $\omega^2 < 0{,}001$], as fases do ciclo estral [$F(3, 30) = 1.101$, $p > .05$; $\omega^2 = 0{,}001$],ou na interação entre grupos e fases do ciclo [$F(3, 30) = 0.075$, $p > .05$; $\omega^2 < 0{,}001$] quando comparadas as probabilidades em que o IP foi estabelecido.

Também foi comparada a probabilidade média em vigor na alternativa LR e a probabilidade real experienciada pelos animais quando o IP foi estabelecido (Figura 1.6). Para compreensão desse resultado deve-se considerar que é possível calcular, teoricamente, quantas pelotas de ração o animal pode receber em cada alternativa quando o IP é estabelecido. Por exemplo, se o IP fosse estabelecido quando a probabilidade de LR fosse de 50%, se o animal escolhesse cada alternativa em metade das tentativas (10 tentativas em cada alternativa), esperava-se que ele obtivesse cerca de 15 pelotas na alternativa LR e 20 pelotas na alternativa SS; se o IP fosse estabelecido quando a probabilidade em LR fosse de 60%, o animal deveria obter 18 pelotas em LR e 20 em SS, e assim por diante. No entanto, é possível que a probabilidade de fato experienciada pelos animais tenha sido maior ou menor que a programada; por exemplo, se a probabilidade em LR era de 50%, a ração estaria disponível em 10 das 20 tentativas; caso o animal escolhesse essa alternativa em 10 tentativas, ele poderia obter alimento em mais que cinco tentativas ou em menos que cinco, o que alteraria a probabilidade de fato experienciada pelo animal.

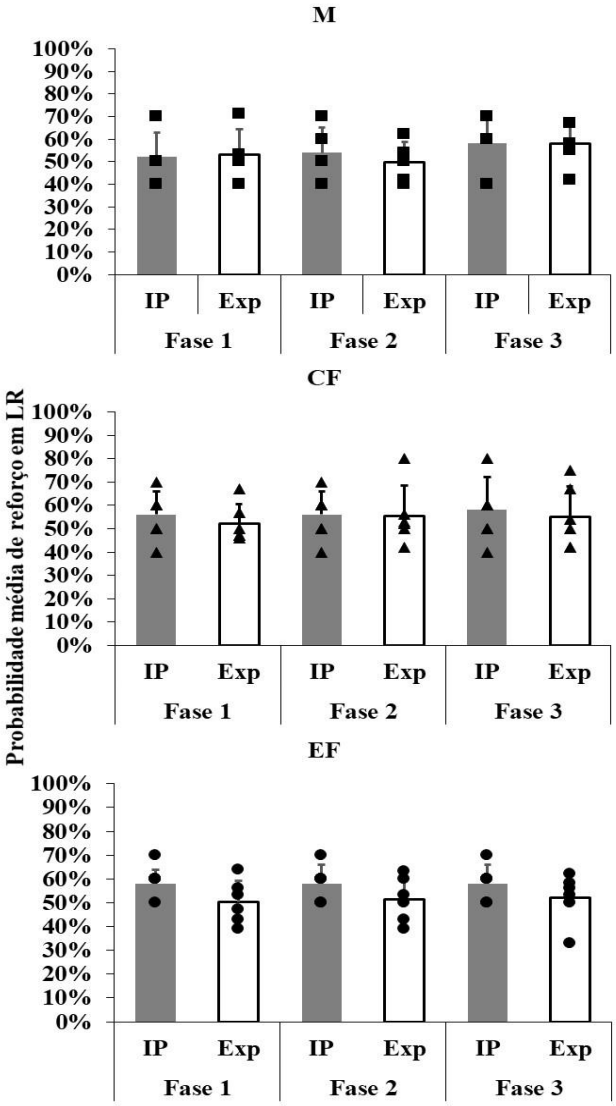

Figura 1.6. Probabilidade média programada de reforço na alternativa LR como função do ponto de indiferença estabelecido pelo animais (IP), e a probabilidade real experienciada (Exp) pelos animais do grupo de Machos (M), Fêmeas Controle (CF) e Fêmeas experimentais (EF). Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos.

Como pode ser observado na Figura 1.6 a probabilidade real experienciada (Exp) por cada grupo em cada fase do ciclo foi semelhante à probabilidade programada na alternativa LR quando o IP foi estabelecido. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou que não houve diferenças estatisticamente significativas na comparação entre a probabilidade de LR no IP e a probabilidade real nos diferentes grupos (M, CF e FC) [$F(2, 14) = 0.013$; $p >$

0.05; $\omega^2 < 0.001$], nem ao comparar as probabilidades nas diferentes fases do ciclo reprodutivo [$F(2, 28) = 0.086$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$], ou interação entre grupos, fases do ciclo e probabilidade [$F(4, 28) = 0.446$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$].

Na Figura 1.7 são apresentadas a probabilidade real experienciada e a probabilidade em vigor na alternativa LR quando o IP foi estabelecido para cada animal e em cada fase do experimento, sendo que cada uma delas foi dividida com base no tempo de cada etapa do ciclo reprodutivo das fêmeas experimentais. Os pontos acima da linha teórica indicam que o animal experienciou probabilidade mais alta que a programada, e pontos abaixo da linha, que o animal experienciou probabilidade mais baixa que a programada.

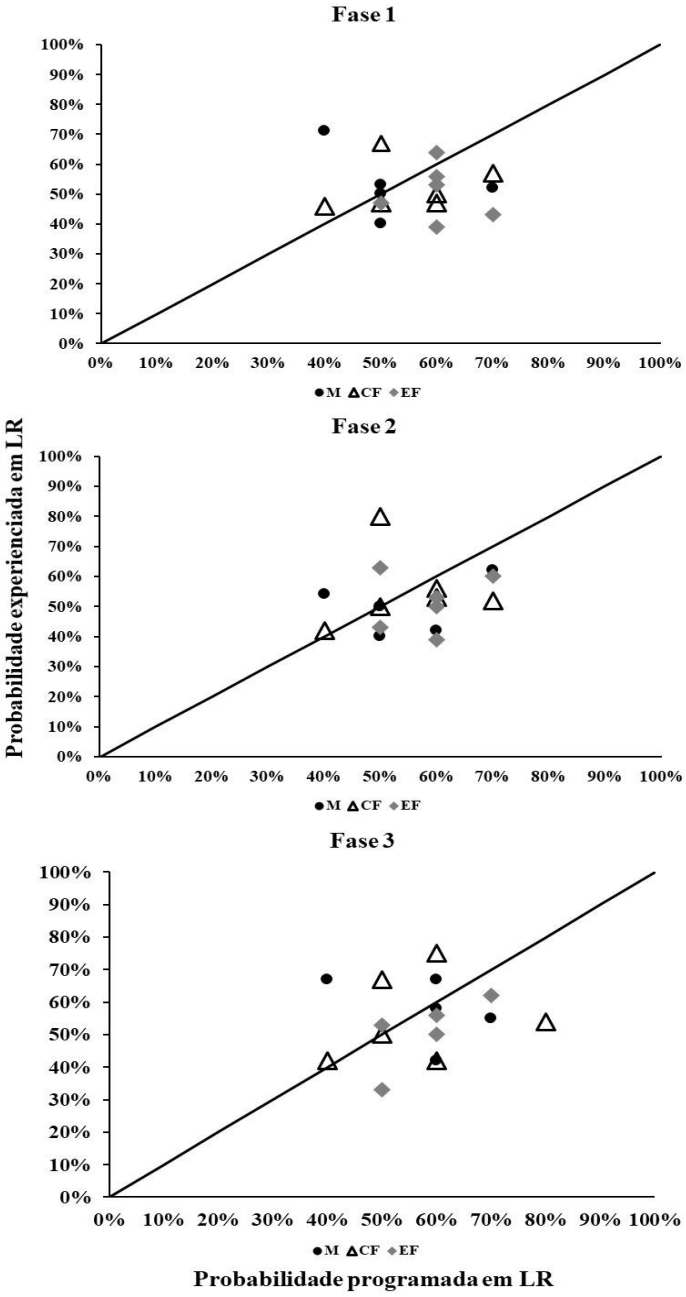

Figura 1.7. Probabilidade experienciada em função da probabilidade programada na alternativa LR quando o IP foi estabelecido, em cada fase do experimento, por machos (M), fêmeas controle (CF) e fêmeas experimentais (EF). A linha sólida representa os pontos em que os valores do eixo x e y coincidem.

Como pode ser observado na Figura 1.7, a probabilidade experienciada pelos animais em todas as fases do experimento ficou entre 35% e 70%, com exceção de um macho e uma fêmea experimental. A maioria dos animais experienciou probabilidade inferior à programada

em LR quanto atingiu o IP em todas as fases do ciclo (pré-gestação, gestação e lactação). Em especial, observa-se que quase todas as fêmeas experimentais, que efetivamente estavam no período de lactação (Fase 3), experimentaram probabilidade média menor que a programada em LR, a despeito de se observar o aumento do número de animais que experienciaram probabilidade igual ou maior que a programada ao longo desse período. Especificamente em relação às fêmeas experimentais observa-se que em todas as fases do experimento o IP se manteve quando a probabilidade programada em LR estava entre 50 e 70%, mas a probabilidade experienciada esteve entre 40 e 60% na fase pré-gestacional (Fase 1); entre 35 e 60% durante a gestação (Fase 2) e entre 30 e 60% na lactação (Fase 3).

Foi comparado, ainda, o consumo médio real de ração pelos sujeitos na alternativa LR quando atingiram o IP durante as três últimas sessões de cada fase do experimento e o consumo possível em relação à probabilidade programada nessa alternativa. A Figura 1.8 apresenta a quantidade de pelotas de ração que poderia ser recebida pelos animais a partir da probabilidade programada (consumo teórico), e quanto eles realmente consumiram ao escolher essa alternativa (consumo real).

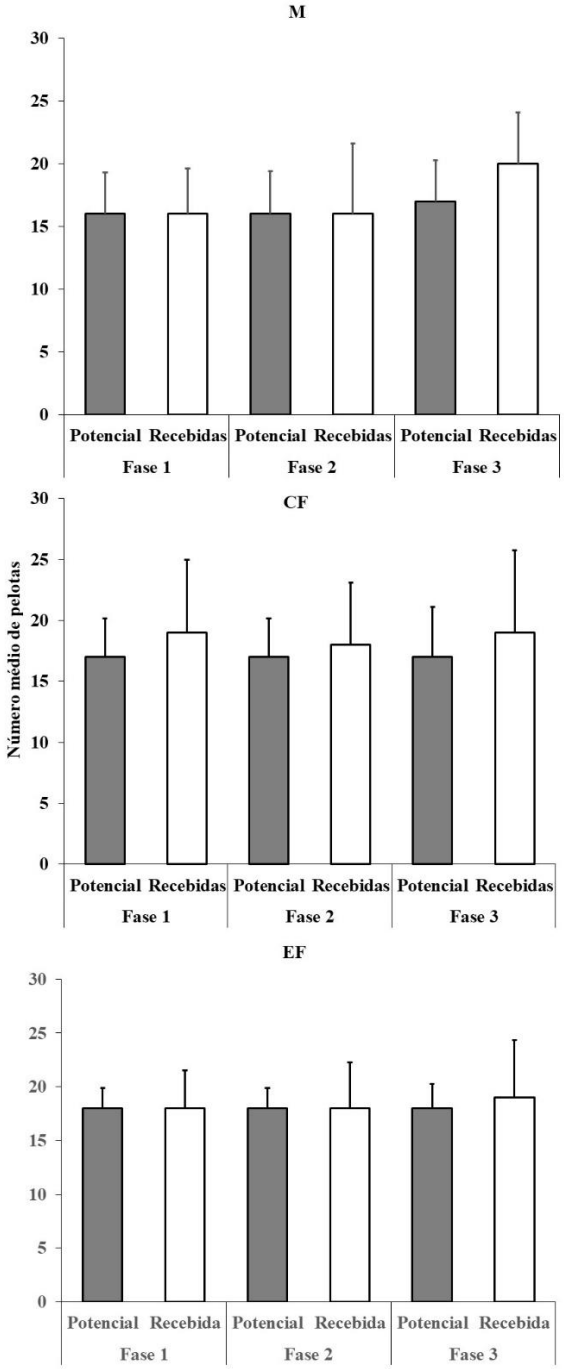

Figura 1.8. Número médio de pelotas de ração programadas para serem liberadas (Potencial) na alternativa LR e efetivamente recebidas (Recebidas) pelo grupo de machos (M), fêmeas controle (CF) e experimentais (EF), nas três últimas sessões de cada fase do experimento. As barras cinza indicam a quantidade de pelotas programadas que os animais receberiam, caso escolhessem LR em aproximadamente metade das tentativas. As barras brancas indicam quantas pelotas os animais efetivamente receberam ao escolher LR. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas e n=5 para o grupo de machos.

Como pode ser observado na Figura 1.8, em média o consumo real de pelotas de ração foi próximo daquele possível pelas contingências programadas, o que confirma que a probabilidade experienciada pelos animais foi, em média, próxima da programada.

Discussão

De acordo com os resultados do presente estudo, o ciclo reprodutivo das fêmeas não interferiu na sua propensão ou aversão a uma alternativa probabilística, uma vez que não foram observadas mudanças significativas no IP desses animais ao longo do procedimento. A mesma estabilidade no IP foi observada nos machos e nas fêmeas controle ao longo do procedimento. Esses resultados sugerem que as diferentes fases do ciclo reprodutivo não são determinantes, isoladamente, de eventuais mudanças no padrão de propensão ou aversão ao risco nas condições estudadas. Além disso, tanto machos como fêmeas estabeleceram o IP quando a probabilidade de reforço na alternativa LR era de 40 a 60%, independentemente do período reprodutivo no qual as fêmeas se encontravam, e mantiveram esse IP ao longo de todo o procedimento.

Há uma tendência crescente no estudo de diferenças comportamentais e fisiológicas entre os sexos, em parte motivada por políticas de financiamento que privilegiam pesquisas que estudam o sexo como uma variável biológica (Beery & Zucker, 2011; Shansky, 2018). Em decorrência desse crescente número de pesquisas, especialmente com roedores (*R. norvegicus*), tem-se encontrado diferenças entre machos e fêmeas em diferentes tipos de medidas comportamentais. Especificamente em tarefas de escolha envolvendo alternativas probabilísticas (tarefas de risco) para obtenção do reforço, alguns autores têm relatado diferentes padrões de desempenho entre os sexos. Os diferentes procedimentos adotados nas pesquisas, porém, podem dar indicações das variáveis responsáveis por essas diferenças.

O risco de punição na alternativa com maior magnitude de reforçador parece ser uma variável importante na diferença de padrão e escolhas entre machos e fêmeas. Orsini et al. (2016), por exemplo, verificaram que fêmeas são mais avessas ao risco que machos em situações em que a alternativa com maior quantidade de alimento vem acompanhada de

probabilidade de choque. Na mesma direção, Van den Bos et al. (2012) também encontraram diferenças entre machos e fêmeas em uma tarefa de escolha envolvendo uma alternativa com maior quantidade de pelotas de açúcar, mas com alta probabilidade de obtenção de pelotas de açúcar com quinino (alternativa menos vantajosa); e outra alternativa que entregava uma pelota de açúcar com alta probabilidade e baixa probabilidade de punição– alternativa mais vantajosa a longo prazo. Nessas condições, machos escolheram com maior frequência a alternativa mais vantajosa e estabeleceram essa preferência mais rapidamente que as fêmeas. Pellman Schuessler, Tellakat e Kim (2017) verificaram que machos e fêmeas utilizam diferentes estratégias de forrageamento em situações que envolvem punição, em uma situação experimental mais naturalística. A pesquisa utilizou um sistema de economia fechada, no qual a necessidade de obter comida e água e a necessidade de evitar ameaças foram simultaneamente integradas à vida dos animais. Para obter alimento, os animais tinham que passar por uma plataforma onde levavam choques de curta duração e baixa intensidade. Os machos otimizam sua resposta passando poucas vezes para o lado com alimento, porém coletando maior quantidade do mesmo, enquanto as fêmeas diminuíram sua ingestão de alimento para evitar a situação aversiva. Quando os choques foram suspensos os machos voltaram mais rapidamente a entrar no compartimento com alimento que as fêmeas. O conjunto desses estudos sugerem que machos e fêmeas apresentam uma sensibilidade diferencial à punição, sendo que as fêmeas, ao menos aparentemente, são mais avessas a alternativas que envolvem punição explícita (choque ou quinino) que os machos.

Em situações de escolha probabilística que não envolvem punição, porém, as diferenças entre machos e fêmeas tendem a ser menos evidentes ou não existir. No estudo de Wallin-Miller, Chesley, Castrillon, e Wood (2017), por exemplo, tanto machos quanto fêmeas (*R. norvegicus*) estabeleceram preferência por uma alternativa probabilística com maior quantidade de alimento em detrimento da alternativa com menor porção de ração,

porém segura. Nos machos, mas não nas fêmeas, a preferência por esta alternativa aumentou após a administração de álcool. Os resultados obtidos por Wallin-Miller et al. sugerem que, na situação estudada, os machos foram mais sensíveis ao reforçador oferecido que as fêmeas, o que tem sido sugerido por outros autores (e.g., Pellman, Schuessler, Tellakat, & Kim, 2017), mas não foram verificadas diferenças entre os sexos em relação à tomada de risco.

Alguns autores justificam as diferenças encontradas entre machos e fêmeas por razões evolutivas, relacionadas com suas diferentes funções na natureza (Bjorklund & Kipp, 1996; Orsini et al., 2016; Orsini & Setlow, 2017; Yoest, Cummings, & Becker, 2014). Em uma revisão sobre esses argumentos, Orsini e Setlow (2017) destacam que a sensibilidade à punição e ao reforço podem estar relacionadas à maior propensão ao risco encontrada entre machos, em comparação às fêmeas (Orsini et al., 2016; Wallin-Miller et al., 2017), o que, por sua vez, está relacionado ao sucesso reprodutivo e à sobrevivência. As fêmeas, por exemplo, seriam mais avessas ao risco, pois precisam garantir a sua sobrevivência e de seus filhotes, uma vez que são responsáveis diretamente pela alimentação deles através da amamentação. Os machos, por sua vez, não possuem uma relação direta com sua prole, e por isso poderiam arriscar com maior frequência e escolher alternativas que potencialmente pudessem lhes trazer maior quantidade de alimento, ainda que com riscos (Vieira, 2003). Além disso, na natureza o sucesso reprodutivo de machos depende da competição com outros machos e de sua habilidade em obter recursos frente a situações de perigo, o que favoreceria uma maior sensibilidade ao reforço (Orsini et al., 2017).

Na presente pesquisa, porém, não foram encontradas diferenças no desempenho de machos e fêmeas na situação de escolha envolvendo alternativa probabilística de obtenção de alimento, dando suporte a outros estudos que também não verificaram diferença entre sexos; em tarefas que não envolvem risco de punição (e.g.,Chowdhury et al., 2019; Donovan et al., 2018). A ausência de diferenças entre machos e fêmeas nessa situação de escolha envolvendo

alternativa probabilística pode ser compreendida pelas condições experimentais dispostas no procedimento. Todos os sujeitos encontravam-se em condições de alimentação suficientes, sem necessidade de assumir riscos e gastar energia adicional para obter a quantidade de alimento necessária para satisfazer suas necessidades diárias. Em termos de sobrevivência, portanto, o IP estabelecido garantia a todos os animais a obtenção de quantidade de alimento suplementar à dieta normalmente recebida e suficiente para suprir suas necessidades. Ao mesmo tempo, as condições dispostas no experimento não envolviam a probabilidade de punição explícita, variável que poderia, de acordo com a literatura, levar a um padrão de escolhas diferente entre machos e fêmeas. Assim sendo, nas condições dispostas no experimento, machos e fêmeas apresentaram padrões semelhantes de desempenho na tarefa de escolha probabilística, indicando que a variável sexo não foi determinante desse padrão.

A hipótese inicial desse estudo era de que a condição de gravidez ou lactação das fêmeas pudesse ser determinante de uma maior aversão ao risco (estabelecimento de IP em probabilidades mais altas em LR em comparação a machos e fêmeas controle), uma vez que a necessidade de se manter e aos seus filhotes saudáveis poderia fazer com que a fêmea preferisse a alternativa mais segura para obtenção de alimento. No entanto, esta hipótese não foi confirmada. Em termos fisiológicos, a gravidez e a lactação produzem diferenças no padrão alimentar de ratas: aumento na ingestão alimentar total na fase de gestação e lactação (Ôta & Yokoyama, 1967; Slonaker, 1925), com aumento de nutrientes específicos, como carboidratos e proteínas (Dial & Avery, 1991), e cálcio (Woodside & Millelire, 1986). Esses estudos mostram que, dependendo das necessidades nutricionais (e.g., deficiência de ferro, necessidade de consumo de proteína), fêmeas que passam por gestação e lactação podem selecionar dietas que supram suas necessidades nutricionais.

Nenhuma dessas condições, porém, foram induzidas na presente pesquisa, uma vez que as ratas não passaram por restrição de nutrientes específicos e nem tinham condições de

estabelecer sua própria dieta. Além disso, o ajuste feito na dieta das fêmeas controle ao longo da gestação e lactação foi suficiente para mantê-las saudáveis e para que seus filhotes fossem alimentados. Nessas condições, portanto, a variável biológica investigada (fase do ciclo reprodutivo) não pareceu ser suficiente para estabelecer diferenças no padrão de escolha.

Outra variável estudada, o ciclo estral, também é apontado na literatura como um fator que pode alterar o desempenho de fêmeas em diferentes tarefas. Devall, Santos e Lovick (2011), por exemplo, verificaram diferenças na emissão de respostas ansiogênicas em ratas fêmeas: quando elas estavam na fase do diestro tardio pareciam ser mais propensas a emitir essas respostas do que nas outras fases do ciclo estral. Uban, Rummel, Floresco e Galea (2012) mostraram que o hormônio estradiol, o qual varia ao longo do ciclo estral, pode influenciar o desempenho de fêmeas em tarefas de escolha envolvendo diferentes custos de resposta.

Outros estudos, porém, mostram que o comportamento de escolha não é influenciado pelas fases do ciclo estral (Orsini et al., 2016; van den Bos et al., 2012). Essas divergências sugerem que talvez o comportamento de escolha não depende diretamente do ciclo estral, mas de fatores específicos, como o valor/magnitude do reforço, o esforço que o animal gasta para ter acesso ao reforçador ou a espera/probabilidade para obter o reforçador. No presente estudo, as fases do ciclo estral não pareceram ser variáveis determinantes para a propensão ou aversão ao risco em fêmeas, indicando que esta variável pode ser relevante apenas quando associada a outras, como o custo da resposta.

Analisando a probabilidade em LR na qual os IPs foram estabelecidos, observa-se que a maioria dos animais ficou indiferente às alternativas quando a probabilidade programada estava entre 50 e 70%. Considerando a probabilidade experienciada, o IP foi estabelecido quando LR oferecia entre 30 e 70% de chances de obtenção de reforço. Em todos esses casos, a alternativa LR era menos vantajosa do que SS, uma vez que, matematicamente, as

alternativas se igualavam quando a probabilidade em LR estava em 70%. A magnitude do reforçador tem sido referida na literatura como uma variável importante na determinação do padrão de escolha dos animais entre alternativas que envolvem probabilidade ou atraso. Mazur (1988a), afirma que provavelmente os animais são mais sensíveis à quantidade de reforço entregue em cada alternativa, do que à probabilidade em vigor na alternativa com maior magnitude de reforçador. O autor identificou, por exemplo, que a preferência pela alternativa com maior número de pelotas de alimento é diferente em 4 vs. 8 pelotas e 1 vs. 2 pelotas, ainda que, em ambas as condições, a alternativa probabilística entregasse o dobro de pelotas da alternativa segura. Zoratto et al. (2016), estudando dois grupos de rato expostos a diferentes quantidades de alimento na alternativa segura e na alternativa probabilística (1 vs 5 pelotas e 2 vs 6 pelotas), verificaram que o grupo 2 vs 6 pelotas mudou sua preferência para a alternativa segura muito antes que os animais do outro grupo. De acordo com Zoratto et al. esse resultado indica que o contraste entre 1 pelota versus 5, além da proporção entre as alternativas (cinco vezes mais contra três vezes mais comida na alternativa probabilística para o segundo grupo) devem ter contribuído significativamente para que os animais do grupo 1 vs 5 pelotas mantivessem sua preferência pela alternativa probabilística por mais tempo, mesmo em probabilidades claramente desvantajosas.

O conjunto dos resultados obtidos por Mazur (1988a) e por Zoratto et al. (2016) sugerem que os resultados obtidos no presente estudo podem estar relacionados também à diferença na magnitude do reforçador utilizada nas duas alternativas. Além de não haver risco explícito à integridade física dos animais, uma vez que eles obtinham alimentação suficiente para sua manutenção fora do ambiente experimental, a diferença entre as alternativas pode ter levado os animais a estabelecer um ponto de indiferença um pouco abaixo do ponto de indiferença teórico, mas não tão abaixo que caracterizasse uma escolha de risco. Mesmo em condições de gestação e lactação, o grupo de fêmeas experimentais não apresentou mudanças

no IP estabelecido ao longo do procedimento, indicando que, em condições favoráveis de alimentação e sem risco explícito, nem de punição, e nem de ameaça à integridade física pela falta de nutrientes para si e sua prole, não havia qualquer pressão específica que justificasse uma mudança no padrão de escolhas. É possível que se a diferença na quantidade de alimento entregue em ambas as alternativas do presente estudo fosse maior (e.g., 2 vs 4 pelotas, como no estudo de Mazur, ou 1 vs 5 pelotas, como no estudo de Zoratto), eventuais mudanças no comportamento de escolha dos animais poderiam ter sido observadas, especialmente no grupo experimental. A diferença na magnitude de reforço presente nas duas alternativas pode interagir com variáveis biológicas como o sexo e o ciclo reprodutivo, elucidando aspectos inexplorados dessa interação. Essa variável deve ser melhor investigada em estudos futuros.

Algumas limitações deste estudo devem ser levadas em consideração. As fêmeas controle não foram expostas aos machos, de maneira que não puderam acasalar, o que pode ter afetado as condições deste grupo. Além disso, considerando que este estudo é exploratório, variáveis como a diferença na quantidade de alimento nas alternativas disponíveis, nível de privação dos animais e a introdução de risco explícito na alternativa probabilística devem ser exploradas em estudos futuros com fêmeas em diferentes fases do ciclo para se verificar se os resultados obtidos aqui se mantêm ou não sob diferentes condições experimentais.

Os resultados aqui descritos trazem avanços no sentido de sugerir que as diferentes fases do ciclo reprodutivo, isoladamente, não interferem de forma significativa em mudanças na propensão ou aversão ao risco de fêmeas gestantes ou lactantes, em condições de alimentação suficiente para sua manutenção e de seus filhotes. Da mesma forma, o sexo não se mostrou uma variável relevante nas condições estudadas. Futuras pesquisas devem aprofundar as condições em que a gravidez e a lactação podem interferir em tomadas de decisão de risco em fêmeas, como em condições de restrição/privação alimentar, ou o risco

de exposição à estimulação aversiva. Esses resultados reafirmam a importância de se estudar diferenças entre os sexos mas, principalmente, a relevância de se investigar o ciclo reprodutivo como uma variável biológica que pode afetar o comportamento de fêmeas.

ESTUDO 2

Comportamento de escolha entre alternativas probabilísticas de fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus)* não é afetado pela privação alimentar nas diferentes fases do ciclo reprodutivo

RESUMO

Uma das variáveis que influencia diferencialmente o comportamento, inclusive o de escolha, é a privação alimentar. O objetivo deste estudo foi investigar se o ponto de indiferença (IP) em uma tarefa de escolha probabilística varia ao longo das fases do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controle. Seis fêmeas controle e oito fêmeas experimentais (mantidas a 75% do peso ad libitum) passaram por sessões de escolha entre duas alternativas que variavam em relação ao número de pelotas de alimento e em sua probabilidade de entrega, ajustada pelo IP. A alternativa probabilística disponibilizava três pelotas de ração, e a probabilidade de obtenção de alimento era ajustada ao longo das sessões; a outra alternativa disponibilizava duas pelotas com 100% de probabilidade. Após atingir o IP todas as fêmeas passaram pela gestação e lactação. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no ponto de indiferença, entre as fases do ciclo reprodutivos e nem entre o grupo com e sem privação alimentar. Em condições ideais de alimentação as fêmeas controle mantiveram o mesmo ponto de indiferença (cerca de 50%) entre as alternativas ao longo do tempo, assim como o grupo experimental. A gestação e a lactação parecem não influenciar a propensão ou aversão ao risco, mesmo quando as condições de alimentação não eram ideais.

Palavras-chave: Comportamento de escolha; gestação; lactação; privação alimentar; ratos Wistar.

ABSTRACT

Food deprivation is the variable that differentially influences behavior, including choice. The aim of this study was to investigate whether the indifference point (IP) in a choice task between probabilistic alternatives varies throughout the reproductive cycle of female Wistar rats submitted to food deprivation when compared to control females. Six control and eight experimental females (maintained at 75% of the weight ad libitum) were submitted to choice tasks with two alternatives that varied in the number of food pellets and their probability of delivery, determined by the IP. The probabilistic alternative provided three food pellets and the probability of obtaining food was adjusted over the trials; the other alternative provided two pellets with a 100% probability of obtaining reinforcement. After establishing the IP, all females went through gestation and lactation. No significant differences were found between the groups in the indifference point through phases of the reproductive cycle and food deprivation condition. In ideal feeding conditions, the control females maintained the same indifference point (about 50%) between alternatives over time, the same happening with the experimental group. Pregnancy and lactation did not seem to influence risk propensity or aversion to the animals' choice, even when feeding conditions were not ideal.

Keywords: Choice behavior; gestation; lactation; deprivation food; Wistar rats.

De acordo com vários estudos, o comportamento de escolha é função de múltiplas variáveis, entre elas o sexo (Orsini et al., 2016; Orsini & Setlow, 2017; Pellman, Schuessler, Tellakat, & Kim, 2017) e a condição alimentar à qual o animal é exposto. Seres humanos, por exemplo, necessitam de quantidades suficientes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, sais minerais e água para sobreviver e manter o equilíbrio orgânico. Essas substâncias se encontram em diferentes quantidades em cada indivíduo, devido a fatores como idade, peso, tamanho (Zucoloto, 2013) e, possivelmente, variam também durante a gestação e a lactação (Richter & Barelare, 1938). O mesmo ocorre com outras espécies de mamíferos.

A variável nutricional tem sido apontada em estudos, principalmente com animais não humanos, como um fator que influencia diferencialmente aspectos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (e.g., Barbosa et al., 2015; Rocinhole, Almeida, & De-Oliveira, 1997). Alguns experimentos mostram que a condição nutricional à qual o animal foi submetido pode provocar dificuldade na aprendizagem e maiores níveis de ansiedade, dentre outros problemas (Almeida, Oliveira, & Graeff, 1990; Reyes-Castro et al., 2011). Tonkiss et al. (1990), por exemplo, submeteram ratos a um procedimento de desnutrição proteica pré-natal e, em seguida, os animais passaram por um esquema de reforçamento diferencial de taxas baixas (DRL18s – esquema em que se reforça o responder espaçado, produzindo taxas de resposta mais baixas). Os animais do grupo experimental, que recebiam uma alimentação com 6% de caseína, demoraram mais para aprender a espaçar suas respostas e a ajustar-se à contingência em vigor, quando comparados ao grupo controle.

Em experimentos envolvendo escolha os animais muitas vezes são submetidos à privação alimentar e, em seguida, precisam escolher entre uma alternativa que oferece pouca quantidade de comida, mas entregue de forma segura, ou uma alternativa que oferece maior quantidade de alimento, mas entregue de forma probabilística, sendo esta última considerada

uma alternativa de risco (Logue & Peña-Correal, 1985; Orsini et al., 2015). Entende-se que quando o animal privado está nessa situação experimental, suas escolhas devem recair na alternativa que lhe garanta maiores chances de satisfazer suas necessidades, ainda que a alternativa mais vantajosa seja acompanhada de algum nível de risco. Porém, quando a necessidade energética é menor os animais podem escolher alternativas com menores riscos, ainda que consigam menor quantidade de alimento (MacArthur & Pianka, 1966). Um exemplo encontrado em ambiente natural é a preferência de caranguejos por mexilhões. Mexilhões maiores possuem mais calorias, mas são mais difíceis de serem abertos, enquanto que os mexilhões menores proporcionam menores valores calóricos, mas são fáceis de serem abertos. De modo geral, caranguejos escolhem maiores quantidades de mexilhões de menor tamanho, uma vez que são mais fáceis de abrir, o que representa um risco baixo. Nessa situação o valor calórico obtido pelos caranguejos é maximizado pelo baixo investimento energético na sua obtenção. Se escolhessem os mexilhões maiores, os animais teriam acesso a maior valor calórico, porém isso demandaria tempo na sua busca e maior esforço para sua obtenção (Smallegance & van der Meer, 2003).

Uma situação semelhante à pesquisada por Smallegance e van der Meer (2003) foi estudada por Caraco (1981), em um estudo com pássaros (*Junco hyemalis*). Na situação experimental apresentada, os pássaros tinham que escolher entre uma alternativa com reforço alimentar constante e outra com reforço variável. O autor observou que o nível de privação alimentar a que os animais foram submetidos influenciou na sua preferência durante os experimentos. Quando os pássaros tinham um ganho energético maior do que a média que eles deveriam receber no dia (ganhavam maior porção de ração, independentemente da situação experimental), eles preferiam a alternativa com quantidade constante de alimento. Se o ganho energético fosse inferior à taxa calculada como minimamente necessária para o animal receber diariamente, então a alternativa com quantidade variável de alimento era a

preferida. Porém, se a ingestão e o ganho energético eram equilibrados, as aves preferiam a alternativa constante ou eram indiferentes entre as alternativas. Esse estudo mostra que a condição nutricional à qual o animal foi submetido previamente ao experimento foi uma variável que influenciou na sua preferência em situações de forrageamento.

Outros estudos de laboratório têm investigado os efeitos de diferentes níveis de privação alimentar sobre o comportamento de escolha de ratos, mas com resultados conflitantes: alguns conseguiram registrar a interferência da privação alimentar sobre o comportamento de escolha, enquanto outros não. Ostaszewski, Karzel e Szafranska (2003), por exemplo, realizaram dois experimentos com ratos machos para verificar mudanças no comportamento de escolha em um procedimento de ajuste do atraso para obtenção do reforço. No primeiro estudo, os animais foram submetidos a cinco etapas de procedimento com diferentes níveis de privação alimentar (fases sem privação alternadas com fases de privação fraca e forte). Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de desconto temporal da alternativa atrasada (diminuição no valor subjetivo do reforço disponibilizado com atraso) em relação aos diferentes níveis de privação alimentar. Outros estudos, realizados com ratos e pombos, também verificaram que diferentes níveis de privação não influenciam o desempenho de animais em tarefas de escolha envolvendo ajuste no atraso para obtenção do reforço alimentar (e.g., Ho et al., 1997) e na quantidade de comida disponível (Oliveira et al., 2013).

Por outro lado, alguns estudos encontraram relação entre a privação alimentar e o comportamento de escolha (Koot, Bos, Adrini, & Laviola, 2009; Orsini et al., 2016; Ostaszewski et al., 2003 – Estudo 2; Ostaszewski, Karzel, & Biataszek, 2004). Esses estudos mostram que diferentes níveis de privação influenciam na taxa de desconto dos animais, bem como na preferência dos animais entre as alternativas com maior ou menor quantidade de alimento, e com ou sem atraso. Ostaszweski et al. (2003 – Estudo 2), por exemplo,

submeteram ratos velhos (com 540 dias de idade) a procedimentos nos quais os animais tinham períodos restritos de acesso à alimentação, e colocou-os posteriormente em um procedimento em que precisavam escolher entre alternativas que variavam com relação à quantidade de reforço obtido, e também com relação ao atraso para ter acesso ao alimento. Os ratos velhos submetidos a procedimentos de restrição aumentaram as taxas de desconto quando comparados a ratos jovens nas mesmas condições. Nesse experimento, os autores verificaram que a idade foi uma variável que interagiu com o nível de privação alimentar na determinação do desempenho dos ratos estudados. Prince et al. (2020) investigaram o efeito da privação em uma tarefa de *delay discounting*, na qual ratos foram expostos a duas alternativas: uma que disponibilizava uma pelota de alimento sem atraso e outra que disponibilizava cinco pelotas com atraso (crescente, de 0, 10, 20, 40 e 60 s). Todos os animais passaram pelas duas condições (com ou sem restrição alimentar). Sob privação, os animais mantiveram maior porcentagem de escolha sobre a alternativa com maior quantidade de alimento entregue com atraso do que na condição de alimentação livre.

Não existe, portanto, consenso sobre a influência que a privação alimentar pode exercer sobre o comportamento de escolha em ratos e nem sobre as possíveis interações entre a privação e outras variáveis. Essa falta de consenso pode estar relacionada a questões metodológicas: os estudos utilizam diferentes desenhos experimentais para estudar o comportamento de escolha, diferentes quantidades de alimento entregues como reforço, e até mesmo diferentes procedimentos de privação ou restrição alimentar, o que pode influenciar nos dados obtidos (Oliveira et al., 2013). Além disso, é comum que as pesquisas que investigam essa relação sejam conduzidas apenas com grupos de machos. Quando fêmeas são utilizadas, geralmente passam por procedimentos de privação para desnutrir as ninhadas (Barbosa et al., 2015), apontando evidências sobre como a falta de alimentos e de nutrientes podem causar efeitos deletérios no desenvolvimento dos filhotes. Nesse sentido, apesar de

muitos estudos terem utilizados fêmeas durante o período de gestação, pouco se sabe sobre o efeito de procedimentos de privação sobre o comportamento dessas gestantes e de fêmeas lactantes.

Diferenças no padrão de comportamento de fêmeas durante o ciclo reprodutivo são importantes para o entendimento da biologia de espécies animais, inclusive em relação a aspectos evolutivos. Como pode ser visto no Estudo 1 desta pesquisa, quando os animais estão em condições ideais de alimentação, não foi possível observar diferenças significativas entre machos e fêmeas, e nem durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo. Apesar disso, alguns estudos mostram que as escolhas dos animais estão relacionadas com o balanço energético que fazem diante das alternativas de escolha com diferentes quantidades de pelotas de ração (Caraco, 1981; MacArthur & Pianka, 1966). Diante dessa questão, e dos dados encontrados no Estudo 1, esse segundo estudo tentou explorar se a privação, que pode colocar em risco a integridade física dos animais, sobretudo de fêmeas em fase de gestação e lactação, pode ser uma variável que interfere no padrão de escolha entre alternativas probabilísticas. Para isso, fêmeas foram mantidas a 75% do peso *ad lib*. e expostas a um procedimento de escolha, ao longo de todo o ciclo reprodutivo (pré-gestação, gestação e lactação). Na tarefa, as fêmeas tinham que escolher entre uma alternativa que disponibilizava duas pelotas de ração com 100% de probabilidade de obtenção (alternativa SS – *small and safe*), e outra que disponibilizava três pelotas, mas com probabilidade variável de obtenção (alternativa LR – *large and risky*) ajustada ao longo do procedimento em função do ponto de indiferença (IP) entre as alternativas. Optou-se, no presente estudo, por manter a proporção de reforçadores entre as alternativas (2 vs 3 pelotas) como no Estudo 1, a fim de melhor comparar os resultados dos dois estudos, isolando apenas a variável nível de privação.

O objetivo deste estudo foi, portanto, verificar se o ponto de indiferença em uma tarefa de escolha probabilística varia ao longo das fases do ciclo reprodutivo em um grupo de

fêmeas submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controles.

ESTUDO 2

Comportamento de escolha entre alternativas probabilísticas de fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus)* não é afetado pela privação alimentar nas diferentes fases do ciclo reprodutivo

RESUMO

Uma das variáveis que influencia diferencialmente o comportamento, inclusive o de escolha, é a privação alimentar. O objetivo deste estudo foi investigar se o ponto de indiferença (IP) em uma tarefa de escolha probabilística varia ao longo das fases do ciclo reprodutivo de fêmeas Wistar submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controle. Seis fêmeas controle e oito fêmeas experimentais (mantidas a 75% do peso ad libitum) passaram por sessões de escolha entre duas alternativas que variavam em relação ao número de pelotas de alimento e em sua probabilidade de entrega, ajustada pelo IP. A alternativa probabilística disponibilizava três pelotas de ração, e a probabilidade de obtenção de alimento era ajustada ao longo das sessões; a outra alternativa disponibilizava duas pelotas com 100% de probabilidade. Após atingir o IP todas as fêmeas passaram pela gestação e lactação. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no ponto de indiferença, entre as fases do ciclo reprodutivos e nem entre o grupo com e sem privação alimentar. Em condições ideais de alimentação as fêmeas controle mantiveram o mesmo ponto de indiferença (cerca de 50%) entre as alternativas ao longo do tempo, assim como o grupo experimental. A gestação e a lactação parecem não influenciar a propensão ou aversão ao risco, mesmo quando as condições de alimentação não eram ideais.

Palavras-chave: Comportamento de escolha; gestação; lactação; privação alimentar; ratos Wistar.

ABSTRACT

Food deprivation is the variable that differentially influences behavior, including choice. The aim of this study was to investigate whether the indifference point (IP) in a choice task between probabilistic alternatives varies throughout the reproductive cycle of female Wistar rats submitted to food deprivation when compared to control females. Six control and eight experimental females (maintained at 75% of the weight ad libitum) were submitted to choice tasks with two alternatives that varied in the number of food pellets and their probability of delivery, determined by the IP. The probabilistic alternative provided three food pellets and the probability of obtaining food was adjusted over the trials; the other alternative provided two pellets with a 100% probability of obtaining reinforcement. After establishing the IP, all females went through gestation and lactation. No significant differences were found between the groups in the indifference point through phases of the reproductive cycle and food deprivation condition. In ideal feeding conditions, the control females maintained the same indifference point (about 50%) between alternatives over time, the same happening with the experimental group. Pregnancy and lactation did not seem to influence risk propensity or aversion to the animals' choice, even when feeding conditions were not ideal.

Keywords: Choice behavior; gestation; lactation; deprivation food; Wistar rats.

De acordo com vários estudos, o comportamento de escolha é função de múltiplas variáveis, entre elas o sexo (Orsini et al., 2016; Orsini & Setlow, 2017; Pellman, Schuessler, Tellakat, & Kim, 2017) e a condição alimentar à qual o animal é exposto. Seres humanos, por exemplo, necessitam de quantidades suficientes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, sais minerais e água para sobreviver e manter o equilíbrio orgânico. Essas substâncias se encontram em diferentes quantidades em cada indivíduo, devido a fatores como idade, peso, tamanho (Zucoloto, 2013) e, possivelmente, variam também durante a gestação e a lactação (Richter & Barelare, 1938). O mesmo ocorre com outras espécies de mamíferos.

A variável nutricional tem sido apontada em estudos, principalmente com animais não humanos, como um fator que influencia diferencialmente aspectos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (e.g., Barbosa et al., 2015; Rocinhole, Almeida, & De-Oliveira, 1997). Alguns experimentos mostram que a condição nutricional à qual o animal foi submetido pode provocar dificuldade na aprendizagem e maiores níveis de ansiedade, dentre outros problemas (Almeida, Oliveira, & Graeff, 1990; Reyes-Castro et al., 2011). Tonkiss et al. (1990), por exemplo, submeteram ratos a um procedimento de desnutrição proteica pré-natal e, em seguida, os animais passaram por um esquema de reforçamento diferencial de taxas baixas (DRL18s – esquema em que se reforça o responder espaçado, produzindo taxas de resposta mais baixas). Os animais do grupo experimental, que recebiam uma alimentação com 6% de caseína, demoraram mais para aprender a espaçar suas respostas e a ajustar-se à contingência em vigor, quando comparados ao grupo controle.

Em experimentos envolvendo escolha os animais muitas vezes são submetidos à privação alimentar e, em seguida, precisam escolher entre uma alternativa que oferece pouca quantidade de comida, mas entregue de forma segura, ou uma alternativa que oferece maior quantidade de alimento, mas entregue de forma probabilística, sendo esta última considerada

uma alternativa de risco (Logue & Peña-Correal, 1985; Orsini et al., 2015). Entende-se que quando o animal privado está nessa situação experimental, suas escolhas devem recair na alternativa que lhe garanta maiores chances de satisfazer suas necessidades, ainda que a alternativa mais vantajosa seja acompanhada de algum nível de risco. Porém, quando a necessidade energética é menor os animais podem escolher alternativas com menores riscos, ainda que consigam menor quantidade de alimento (MacArthur & Pianka, 1966). Um exemplo encontrado em ambiente natural é a preferência de caranguejos por mexilhões. Mexilhões maiores possuem mais calorias, mas são mais difíceis de serem abertos, enquanto que os mexilhões menores proporcionam menores valores calóricos, mas são fáceis de serem abertos. De modo geral, caranguejos escolhem maiores quantidades de mexilhões de menor tamanho, uma vez que são mais fáceis de abrir, o que representa um risco baixo. Nessa situação o valor calórico obtido pelos caranguejos é maximizado pelo baixo investimento energético na sua obtenção. Se escolhessem os mexilhões maiores, os animais teriam acesso a maior valor calórico, porém isso demandaria tempo na sua busca e maior esforço para sua obtenção (Smallegance & van der Meer, 2003).

Uma situação semelhante à pesquisada por Smallegance e van der Meer (2003) foi estudada por Caraco (1981), em um estudo com pássaros (*Junco hyemalis*). Na situação experimental apresentada, os pássaros tinham que escolher entre uma alternativa com reforço alimentar constante e outra com reforço variável. O autor observou que o nível de privação alimentar a que os animais foram submetidos influenciou na sua preferência durante os experimentos. Quando os pássaros tinham um ganho energético maior do que a média que eles deveriam receber no dia (ganhavam maior porção de ração, independentemente da situação experimental), eles preferiam a alternativa com quantidade constante de alimento. Se o ganho energético fosse inferior à taxa calculada como minimamente necessária para o animal receber diariamente, então a alternativa com quantidade variável de alimento era a

preferida. Porém, se a ingestão e o ganho energético eram equilibrados, as aves preferiam a alternativa constante ou eram indiferentes entre as alternativas. Esse estudo mostra que a condição nutricional à qual o animal foi submetido previamente ao experimento foi uma variável que influenciou na sua preferência em situações de forrageamento.

Outros estudos de laboratório têm investigado os efeitos de diferentes níveis de privação alimentar sobre o comportamento de escolha de ratos, mas com resultados conflitantes: alguns conseguiram registrar a interferência da privação alimentar sobre o comportamento de escolha, enquanto outros não. Ostaszewski, Karzel e Szafranska (2003), por exemplo, realizaram dois experimentos com ratos machos para verificar mudanças no comportamento de escolha em um procedimento de ajuste do atraso para obtenção do reforço. No primeiro estudo, os animais foram submetidos a cinco etapas de procedimento com diferentes níveis de privação alimentar (fases sem privação alternadas com fases de privação fraca e forte). Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de desconto temporal da alternativa atrasada (diminuição no valor subjetivo do reforço disponibilizado com atraso) em relação aos diferentes níveis de privação alimentar. Outros estudos, realizados com ratos e pombos, também verificaram que diferentes níveis de privação não influenciam o desempenho de animais em tarefas de escolha envolvendo ajuste no atraso para obtenção do reforço alimentar (e.g., Ho et al., 1997) e na quantidade de comida disponível (Oliveira et al., 2013).

Por outro lado, alguns estudos encontraram relação entre a privação alimentar e o comportamento de escolha (Koot, Bos, Adrini, & Laviola, 2009; Orsini et al., 2016; Ostaszewski et al., 2003 – Estudo 2; Ostaszewski, Karzel, & Biataszek, 2004). Esses estudos mostram que diferentes níveis de privação influenciam na taxa de desconto dos animais, bem como na preferência dos animais entre as alternativas com maior ou menor quantidade de alimento, e com ou sem atraso. Ostaszweski et al. (2003 – Estudo 2), por exemplo,

submeteram ratos velhos (com 540 dias de idade) a procedimentos nos quais os animais tinham períodos restritos de acesso à alimentação, e colocou-os posteriormente em um procedimento em que precisavam escolher entre alternativas que variavam com relação à quantidade de reforço obtido, e também com relação ao atraso para ter acesso ao alimento. Os ratos velhos submetidos a procedimentos de restrição aumentaram as taxas de desconto quando comparados a ratos jovens nas mesmas condições. Nesse experimento, os autores verificaram que a idade foi uma variável que interagiu com o nível de privação alimentar na determinação do desempenho dos ratos estudados. Prince et al. (2020) investigaram o efeito da privação em uma tarefa de *delay discounting*, na qual ratos foram expostos a duas alternativas: uma que disponibilizava uma pelota de alimento sem atraso e outra que disponibilizava cinco pelotas com atraso (crescente, de 0, 10, 20, 40 e 60 s). Todos os animais passaram pelas duas condições (com ou sem restrição alimentar). Sob privação, os animais mantiveram maior porcentagem de escolha sobre a alternativa com maior quantidade de alimento entregue com atraso do que na condição de alimentação livre.

Não existe, portanto, consenso sobre a influência que a privação alimentar pode exercer sobre o comportamento de escolha em ratos e nem sobre as possíveis interações entre a privação e outras variáveis. Essa falta de consenso pode estar relacionada a questões metodológicas: os estudos utilizam diferentes desenhos experimentais para estudar o comportamento de escolha, diferentes quantidades de alimento entregues como reforço, e até mesmo diferentes procedimentos de privação ou restrição alimentar, o que pode influenciar nos dados obtidos (Oliveira et al., 2013). Além disso, é comum que as pesquisas que investigam essa relação sejam conduzidas apenas com grupos de machos. Quando fêmeas são utilizadas, geralmente passam por procedimentos de privação para desnutrir as ninhadas (Barbosa et al., 2015), apontando evidências sobre como a falta de alimentos e de nutrientes podem causar efeitos deletérios no desenvolvimento dos filhotes. Nesse sentido, apesar de

muitos estudos terem utilizados fêmeas durante o período de gestação, pouco se sabe sobre o efeito de procedimentos de privação sobre o comportamento dessas gestantes e de fêmeas lactantes.

Diferenças no padrão de comportamento de fêmeas durante o ciclo reprodutivo são importantes para o entendimento da biologia de espécies animais, inclusive em relação a aspectos evolutivos. Como pode ser visto no Estudo 1 desta pesquisa, quando os animais estão em condições ideais de alimentação, não foi possível observar diferenças significativas entre machos e fêmeas, e nem durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo. Apesar disso, alguns estudos mostram que as escolhas dos animais estão relacionadas com o balanço energético que fazem diante das alternativas de escolha com diferentes quantidades de pelotas de ração (Caraco, 1981; MacArthur & Pianka, 1966). Diante dessa questão, e dos dados encontrados no Estudo 1, esse segundo estudo tentou explorar se a privação, que pode colocar em risco a integridade física dos animais, sobretudo de fêmeas em fase de gestação e lactação, pode ser uma variável que interfere no padrão de escolha entre alternativas probabilísticas. Para isso, fêmeas foram mantidas a 75% do peso *ad lib*. e expostas a um procedimento de escolha, ao longo de todo o ciclo reprodutivo (pré-gestação, gestação e lactação). Na tarefa, as fêmeas tinham que escolher entre uma alternativa que disponibilizava duas pelotas de ração com 100% de probabilidade de obtenção (alternativa SS – *small and safe*), e outra que disponibilizava três pelotas, mas com probabilidade variável de obtenção (alternativa LR – *large and risky*) ajustada ao longo do procedimento em função do ponto de indiferença (IP) entre as alternativas. Optou-se, no presente estudo, por manter a proporção de reforçadores entre as alternativas (2 vs 3 pelotas) como no Estudo 1, a fim de melhor comparar os resultados dos dois estudos, isolando apenas a variável nível de privação.

O objetivo deste estudo foi, portanto, verificar se o ponto de indiferença em uma tarefa de escolha probabilística varia ao longo das fases do ciclo reprodutivo em um grupo de fêmeas submetidas a um procedimento de privação alimentar, comparadas com fêmeas controles.

Método

Sujeitos

Foram utilizadas 14 fêmeas, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, com 60 dias de idade. Dessas fêmeas, seis foram atribuídas por sorteio ao Grupo Controle e oito formaram o grupo experimental (mantidas a 75% do peso ad lib.). Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, foram recebidos aos 21 dias de idade. As fêmeas ficaram alojadas em duplas durante as duas primeiras fases dos experimentos; quando estavam em período de lactação, foram mantidas apenas com seus filhotes, em gaiolas de polipropileno (387cm^2 de área por 17,8cm de altura), forradas com maravalha. A temperatura do biotério variava entre 20 e 24°C, com ciclos claro-escuro diário (12/12 h).

Durante os procedimentos experimentais a disponibilidade de ração foi controlada, sendo parte da porção diária oferecida durante o experimento e o restante disponibilizado na gaiola viveiro após o encerramento da sessão experimental (cerca de 1 hora após o experimento) por um período de três horas. Durante o período de alimentação os animais foram mantidos em caixas individuais para controle de ingestão. O cálculo médio de consumo da ração diária foi feito com base em um controle da ingestão alimentar realizado entre os 60 e 70 dias de idade. Quando as fêmeas entravam no período de gestação, foi realizado um ajuste na alimentação dos grupos controle e experimental para que os animais mantivessem o peso dentro do grupo ao qual pertenciam. O número médio de gramas de ração, calculado com base no grupo controle, era disponibilizado para os animais durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo. A água ficou disponível durante todo o experimento. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (protocolo 16.5.677.59.5).

Análise do ciclo estral, procedimento de cruzamento e redução de ninhada

Nas três etapas deste estudo, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado diariamente a partir dos 60 dias de idade. A coleta do esfregaço vaginal foi feita no período das 8 às 10 horas. A secreção vaginal foi coletada com uma alça de inoculação, que era mergulhada em água e inserida na vagina, retirando o fluído contendo células que eram espalhadas em uma lâmina. Em seguida, a lâmina era corada com corante para uso hematológico (Panótipo Rápido, Laborclin, Paraná, Brasil). Após corada a lâmina foi analisada em um microscópio com luz, nas lentes 10 e/ou 40x. As alterações na aparência citológica foram avaliadas para definir as fases do ciclo estral: Proestro, Estro, Diestro 1 e Diestro 2 (Hubscher, Brooks, & Johnson, 2005). As fêmeas iniciaram os procedimentos experimentais somente após apresentarem um ciclo regular por um período de 10 dias.

O procedimento de cruzamento foi realizado somente no grupo experimental e consistiu em colocar duas fêmeas na caixa viveiro de um macho experimentalmente ingênuo. A ocorrência de espermatozoides no esfregaço vaginal diário indicava o primeiro dia de gestação. No segundo dia de lactação, as ninhadas foram reduzidas para seis filhotes (três fêmeas e três machos), para que as fêmeas tivessem a mesma quantidade de filhotes e para não diferirem quanto ao gasto energético neste período.

Equipamento

Foi utilizado um labirinto em U, o mesmo utilizado no Estudo 1 (Figura 1.3). As sessões foram gravadas por uma filmadora SONY, modelo HDR-CX220, alocada no teto da sala experimental.

Procedimento

Os experimentos iniciaram após as fêmeas terem um ciclo estral regular. A coleta de dados foi realizada cinco dias por semana, sendo a análise do ciclo estral realizada antes de cada sessão experimental. O procedimento foi dividido em três etapas, da mesma maneira que no Estudo 1:

***Etapa 1* – Treino forçado.** O objetivo nessa etapa, assim como no Estudo 1, foi permitir que o animal explorasse o labirinto e tivesse contato com o comedouro, onde havia pelotas de ração. Foram realizadas cinco sessões com 10 tentativas forçadas: em cinco tentativas o animal só conseguia passar pela porta B1, e nas outras cinco pela porta B2. No total foi liberado, nesta etapa inicial, 0,45g de ração na alternativa com três pelotas, e 0,3g na alternativa com duas pelotas, uma vez que cada pelota continha cerca de 0,03g. O intervalo entre as tentativas (IET) foi de 20s.

***Etapa 2* – Ponto de indiferença.** O objetivo nesta etapa foi analisar o ponto de indiferença (IP) entre as alternativas para cada animal individualmente. O protocolo seguido foi o mesmo do Estudo 1. A probabilidade de obtenção do reforço na alternativa LR foi de 50% nas sessões iniciais. Cada tentativa teve duração de 20s, independente da escolha do animal pela alternativa com 100% de probabilidade de obter o reforço (alternativa SS – *small and safe*) ou pela de menor probabilidade de obter o reforço (alternativa LR – *large and risky*). O IET foi de 20s. O ponto de indiferença foi estabelecido quando o sujeito escolhesse a alternativa LR entre 40 e 60% das vezes por três dias consecutivos, sem que houvesse tendência ascendente ou descendente na porcentagem de escolha entre as três últimas sessões. Após estabelecido o IP, todas as fêmeas passaram para a etapa seguinte, exceto as fêmeas que não engravidaram.

***Etapa 3* – Ponto de indiferença entre fases do ciclo reprodutivo.** O objetivo nessa etapa foi verificar se o IP verificado na etapa anterior seria mantido ou não durante o período de gestação e lactação do grupo experimental, em comparação com o grupo de fêmeas controle. Antes de iniciarem as sessões, as fêmeas foram colocadas para cruzar. Durante o período em que estavam alojadas junto aos machos, as fêmeas não passavam pelas sessões experimentais. No segundo dia de gestação iniciou-se a Etapa 3 para o grupo experimental e os mesmos critérios definidos na Etapa 2 foram seguidos. No período de lactação, a coleta de dados iniciou-se um dia após o nascimento dos filhotes. Foram utilizados os mesmos critérios da Etapa 2 com a mesma probabilidade que a alternativa LR foi encerrada na etapa anterior.

Análise de dados

A média do ponto de indiferença em cada fase do ciclo estral foi calculado e submetido a uma ANOVA de medidas repetidas. O média de peso dos animais no primeiro dia de cada fase do ciclo reprodutivo foi calculada. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de homogeneidade e de esfericidade (Teste Shapiro-Wilk para normalidade, Teste de Levene para a homogeneidade e Teste de Esfericidade de Mauchly), como requisitos para a utilização da ANOVA de medidas repetidas. Entretanto, a normalidade dos dados foi rejeitada ($p < 0,05$), de modo que os dados foram transformados em uma função logarítmica de base 10 para a realização da ANOVA de medidas repetidas. Caso a esfericidade dos dados fosse rejeitada, era aplicada a correção Greenhouse-Geisser para os valores de F. Após a realização da ANOVA de medidas repetidas, foi utilizado o post hoc Bonferroni. O tamanho do efeito foi calculado pelo Omega Squered (ω^2). Os valores de ω^2 foram classificados como trivial ($\omega^2 < 0.01$), pequeno ($0.01 < \omega^2 < 0.06$), médio ($0.06 < \omega^2 < 0.14$) ou grande ($\omega^2 > 0.14$).

O número médio de sessões para estabelecer o IP foi calculado, e analisado através do teste t Student's, em que os valores <0.05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) como requisito para a utilização do teste t Student's. A média da probabilidade de reforçamento na alternativa LR foi calculada; para isso foi utilizado o IP das últimas três sessões de cada animal, em cada fase do ciclo reprodutivo. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de homogeneidade e de esfericidade (Teste Shapiro-Wilk para normalidade, Teste de Levene para a homogeneidade e Teste de Esfericidade de Mauchly), como requisitos para a utilização da ANOVA de medidas repetidas. Entretanto, a normalidade dos dados foi rejeitada ($p < 0,05$), de modo que os dados foram transformados em uma função logarítmica de base 10 para a realização da ANOVA de medidas repetidas. O tamanho do efeito foi calculado pelo Omega Squered (ω^2).

Devido à discrepância que pode ocorrer entre a probabilidade programada pelo experimentador para ter acesso ao reforço em maior quantidade e a probabilidade realmente experienciada pelos animais (p), foi calculado o valor de "p" realmente experimentado por cada grupo de animais. Para isso foi calculado o número de entradas bem-sucedidas em LR (entradas em que realmente o animal encontrou comida); esse valor foi dividido pelo número total de tentativas em que o animal poderia entrar em LR em uma sessão, e esse número foi multiplicado por cem (entregas bem-sucedidas em LR/ demanda total em LR x 100) (Zoratto et al., 2016). Após o cálculo da porcentagem experienciada, todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de homogeneidade e de esfericidade (Teste Shapiro-Wilk para normalidade, Teste de Levene para a homogeneidade e Teste de Esfericidade de Mauchly), como requisitos para a utilização da ANOVA de medidas repetidas. Como a normalidade dos dados foi rejeitada ($p < 0,05$) os dados foram transformados em uma função logarítmica de base 10 para a realização da ANOVA de medidas repetidas. Em seguida a média da

probabilidade de reforçamento na alternativa LR foi submetida à análise de variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas com grupos, para comparar se houve diferença entre o IP estabelecido pelo protocolo aplicado e o valor de “p”, nas diferentes fases do ciclo reprodutivo e entre o grupo controle e experimental. A análise estatística foi feita através do software JASP 0.10.2.0 para Windows (Amsterdam, The Netherlands) com p-valor de <0.05 considerados estatisticamente significativos (intervalo de confiança de 95%).

Resultados

Considerando que no grupo experimental algumas fêmeas não engravidaram, parte dos resultados foram analisados em relação a três grupos distintos: grupo controle (CF - n=6), grupo experimental (EF - n=4) e grupo experimental não-grávidas (EF-NP - n= 4). Os pesos das fêmeas do grupo CF, EF e EF-NP foram analisados por meio da ANOVA de medidas repetidas, e os dados estão apresentados na Figura 2.1.

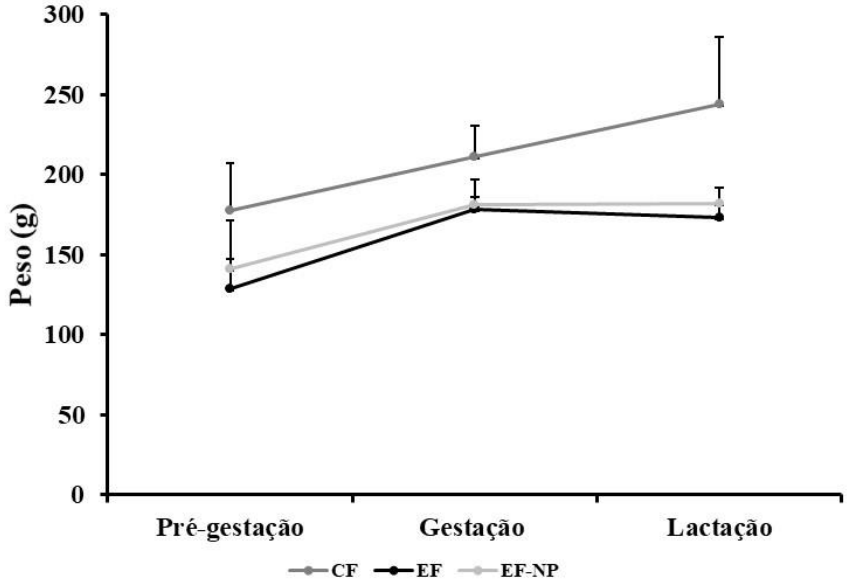

Figura 2.1. Peso das fêmeas do grupo controle (CF), grupo experimental (EF) e fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP), nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para o grupo CF, n=4 para o grupo de EF e n=4 para o grupo de EF-NP.

Na Figura 2.1 é possível observar o ganho de peso dos animais ao longo do tempo. A ANOVA identificou diferença estatisticamente significativa quando comparado o peso dos animais nas diferentes fases do ciclo reprodutivos [$F(2, 22) = 31.733$; $p < 0.001$; $\omega^2 > 0.532$], indicando que houve um aumento de peso durante as diferentes fases. Diferenças estatísticas entre o peso dos grupos também foram encontradas [$F(2, 11) = 11.512$; $p = 0.002$; $\omega^2 = 0.600$]. Ao realizar o post hoc Bonferroni, para verificar as diferenças entre os grupos, foi

possível notar diferença estatisticamente significativa ao comparar o CF e o EF (p>0,05), e entre o CF e EF-NP (p>0,05). Esses resultados mostram que o procedimento de privação alimentar nos grupos experimentais foi capaz de reduzir o peso dos animais e o ganho de peso ao longo do procedimento. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos EF e EF-NP (p<0,05), que tiveram aumento de peso praticamente igual ao longo do tempo.

Os dados referentes ao período de gestação das fêmeas do grupo controle e dos grupos experimentais são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1.

Tempo de Gestação, Número de Vezes que foi Colocada Para Cruzar, Dias que Levaram Para Cruzar na Tentativa 1, 2 e 3, e Número de Filhotes, das Fêmeas do Grupo Controle (CF) e Experimental (EF).

Animais	**Tempo gestação**	**Número de cruzamentos**	**Dias de cruzamento**			**No. Filhotes**
			Tt. 1	**Tt. 2**	**Tt.3**	
CF1	22 dias	1	3 dias	------	------	9 filhotes
CF2	21 dias	1	12 dias	------	------	9 filhotes
CF3	22 dias	1	3 dias	------	------	10 filhotes
CF4	22 dias	1	4 dias	------	------	8 filhotes
CF5	21 dias	1	4 dias	------	------	9 filhotes
CF6	21 dias	2	1 dia	26 dias	------	9 filhotes
EF1	21 dias	1	2 dias	------	------	9 filhotes
EF2	19 dias	2	4 dias	15 dias	------	10 filhotes
EF3	21 dias	2	3 dias	7 dias	------	7 filhotes
EF4	21 dias	2	3 dias	3 dias	------	9 filhotes
EF-NP1	------	1	24 dias	------	------	------
EF-NP2	------	2	19 dias	20 dias	------	------
EF-NP3	------	3	3 dias	2 dias	10 dias	------
EF-NP4	------	2	5 dias	4 dias	------	------

Nota. As fêmeas EF-NP não engravidaram, mas foram colocadas para cruzar, como aparece no tempo para engravidar.

Na Tabela 2.1 é possível observar que todas as fêmeas do grupo controle e as do grupo experimental que levaram a termo a gestação tiveram praticamente o mesmo número de dias de gestação, em torno de 21 e 22 dias (exceto EF2). Com exceção da EF1, todas as fêmeas experimentais tiveram que ser colocadas para cruzar mais de uma vez, pois na primeira vez que foi encontrado espermatozoide na lâmina do esfregaço vaginal a gravidez não ocorreu ou não prosseguiu. No grupo controle, apenas uma fêmea teve que ser colocada para cruzar mais de uma vez. Com isso, o número de dias para que as fêmeas experimentais engravidassem foi maior, comparado ao grupo controle. Além disso, é possível observar que, em média, tanto as fêmeas controles como as fêmeas experimentais tiveram em torno de 9 filhotes.

O critério utilizado com as fêmeas EF-NP foi de duas tentativas de cruzamento; caso elas não conseguissem entrar em período de gestação nessas duas tentativas, prosseguiriam no procedimento sem tentativas adicionais, como um grupo experimental (sob privação), mas sem passar pelos períodos de gestação e lactação. Esse procedimento foi adotado com EF-NP2 e EF-NP4. EF-NP1 cruzou apenas uma vez, pois dificilmente atingia a fase de Estro, e ficou cerca de 24 dias com o macho para tentar engravidar, sem sucesso. A fêmea EF-NP3 foi colocada para cruzar três vezes, uma vez que nas duas primeiras tentativas foram encontrados espermatozoides na lâmina com apenas dois ou três dias, devido a isso foi feita uma terceira tentativa. Nesta última tentativa foram encontrados espermatozoides após 10 dias, porém a gestação não se efetivou ou não prosseguiu.

Todas as fêmeas, mesmo as que não engravidaram, foram submetidas aos procedimentos experimentais. A Figura 2.2 apresenta o número médio de sessões para o estabelecimento do IP no grupo controle e nos grupos experimentais (EF e EF-NP).

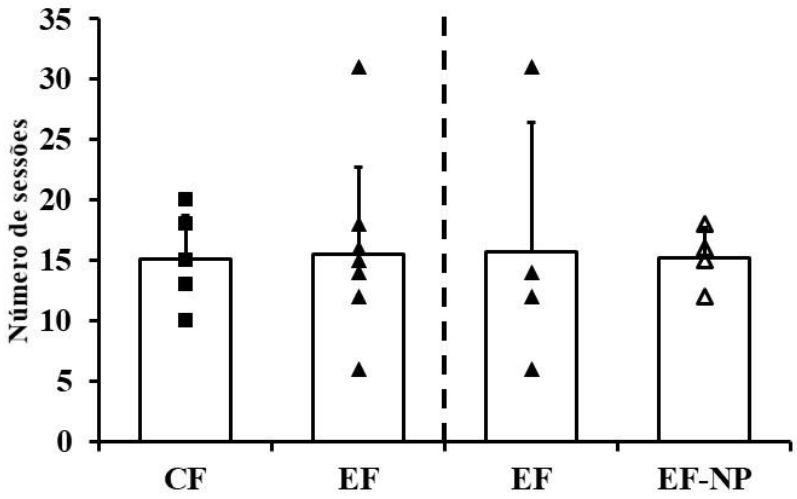

Figure 2.2. Média do número de sessões para alcançar o ponto de indiferença ao comparar o grupo de fêmeas controle (CF) e fêmeas experimentais (EF + EF-NP) – barras à esquerda da linha pontilhada, e ao comparar o grupo de fêmeas experimentais que engravidaram (EF) e as que não engravidaram (EF-NP) – barras à direita da linha pontilhada. Os dados são expressados como média + S.E.M. n=6 para o grupo de fêmeas controle e n=8 para o grupo de fêmeas experimentais.

Os animais dos grupos controle e experimental demoraram, em média, o mesmo número de sessões para atingir o IP (Figura 2.2). O teste t não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ao comparar o número de sessões que os animais levaram para atingir o ponto de indiferença [$T(12) = -0{,}103$; $p > 0.05$]. Não houve diferença, também, no número médio de sessões para atingir o IP do grupo EF e EF-NP, apesar da maior variabilidade desse número de sessões entre as fêmeas que engravidaram. Esses resultados sugerem que a variável privação alimentar não influenciou o número de sessões para o estabelecimento do ponto de indiferença.

Além de comparar o número médio de sessões que cada grupo demorou para estabelecer o ponto de indiferença entre as alternativas, foi verificada a probabilidade média de reforço na alternativa LR quando as fêmeas de todos os grupos estabeleceram o IP durante as diferentes fases do experimento, que foram divididas de acordo com os períodos de pré-

gestação, gestação e lactação das fêmeas que engravidaram (Figura 2.3). Os resultados são apresentados subdividindo o grupo experimental entre as fêmeas que engravidaram (EF) e as fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP).

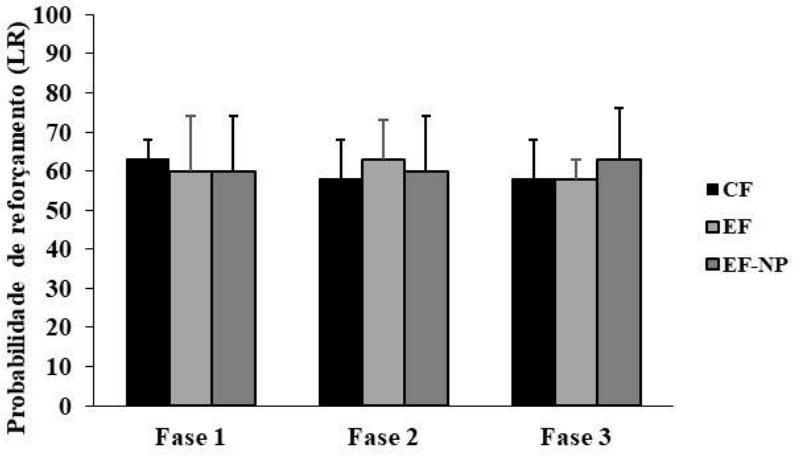

Figura 2.3. Média da probabilidade de reforçamento na alternativa com maior quantidade de alimento e com risco (LR) no ponto de indiferença para fêmeas controle (CF), fêmeas experimentais (EF), e fêmeas do grupo experimental que não engravidaram (EF-NP). Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles, n=4 para o grupo de fêmeas experimentais e n=4 para fêmeas experimentais que não engravidaram.

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas não encontrou diferença estatisticamente significativa ao comparar a probabilidade em vigor em LR quando o IP foi estabelecido nas diferentes fases do ciclo reprodutivo [$F(1.231, 13.539) = 0.069$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$] e nem entre os grupos [$F(2, 11) = 0.019$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$]. Todas as fêmeas estabeleceram o IP quando a probabilidade de obter reforço estava, em média, entre 50% e 60%. Essa probabilidade não variou durante as fases de gestação e lactação (Fase 2 e Fase 3) das fêmeas (grupos CF e EF). Esses resultados sugerem que, nem as fases do ciclo reprodutivo e nem a condição alimentar das fêmeas, influenciaram no estabelecimento do IP ao longo do tempo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos [$F(2, 11) = 0.334$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$], as fases do ciclo estral [$F(3, 33) = 0.732$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$] ou na interação entre grupos e fases do ciclo [$F(6, 33) = 1.168$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.01$] quando comparadas as

probabilidades em que o IP foi estabelecido. Esse dado sugere que o ciclo estral não influenciou no comportamento dos animais ao longo do ciclo reprodutivo.

Foi comparada, ainda, a probabilidade média em vigor na alternativa LR e a probabilidade real experienciada pelos animais quando o IP foi estabelecido (Figura 2.4). Assim como no Estudo 1, seria possível que a probabilidade de fato experienciada (porcentagem de tentativas bem-sucedidas na alternativa LR) fosse maior ou menor que a programada no experimento. Para isso, foi feito o cálculo teórico de quantas pelotas de ração o animal poderia receber em cada alternativa quando o IP foi estabelecido. Por exemplo, se o IP fosse estabelecido quando a probabilidade de LR estivesse em 50%, a ração estaria disponível nessa alternativa em 10 das 20 tentativas. Ao escolher esta alternativa em metade das tentativas (10), esperava-se que, teoricamente, o animal obtivesse cerca de 15 pelotas em LR (três pelotas em cinco tentativas) e 20 pelotas em SS (duas pelotas em todas as 10 tentativas). Seguindo essa lógica, ainda em termos teóricos, a porcentagem em LR que possibilitaria ao animal chances praticamente iguais de obtenção de ração nas duas alternativas era em 70%, podendo obter 21 pelotas em LR e 20 pelotas na alternativa SS. Isso significa que se o IP fosse estabelecido em probabilidades menores que 70%, o total de alimento obtido na sessão na alternativa LR seria inferior ao obtido em SS, de tal forma que a alternativa SS, ainda que contendo menor quantidade de alimento, seria mais vantajosa que LR.

No entanto, na prática seria possível ao animal ter maior ou menor sucesso que o programado na alternativa LR em função da distribuição aleatória das tentativas bem-sucedidas em LR (aquelas em que a comida estava disponível), o que alteraria a probabilidade real experienciada. A Figura 2.4 apresenta a probabilidade programada em vigor em LR quando o IP foi estabelecido e a probabilidade real experienciada pelos sujeitos,

ao longo de todas as fases do experimento, que foram divididas segundo os períodos do ciclo reprodutivo das fêmeas que engravidaram.

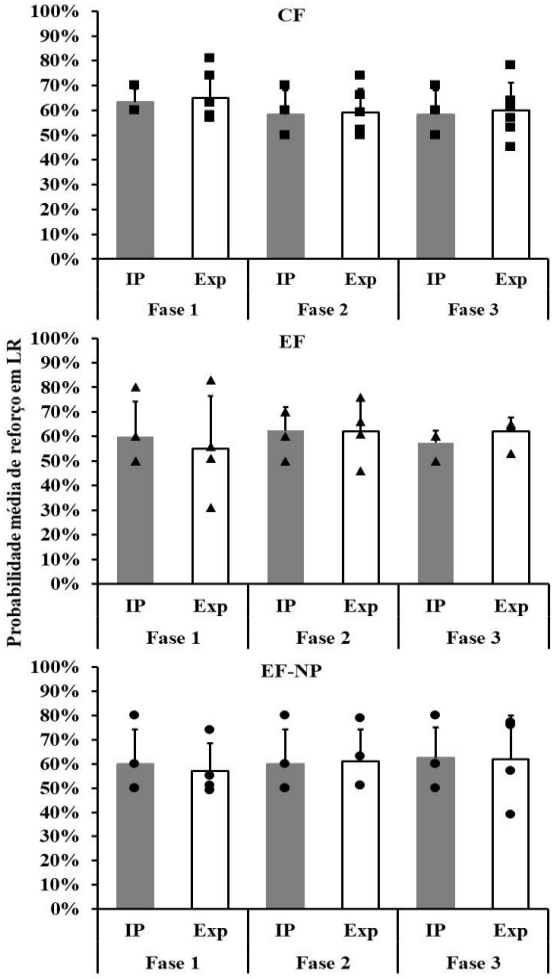

Figura 2.4. Probabilidade média de reforço programada na alternativa LR quando o ponto de indiferença foi estabelecido (IP), e a probabilidade real experienciada (Exp) pelos animais do grupo de Fêmeas Controle (CF), Fêmeas experimentais (EF), e Fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP), ao longo de todo o estudo. Os dados são expressos como média + S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles e n=4 para o grupo de fêmeas experimentais e fêmeas não grávidas.

O IP foi estabelecido quando a probabilidade de obtenção do reforço em LR estava, em média, entre 50% e 70% em todos os grupos, e nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. O mesmo pode ser observado ao analisar a probabilidade experienciada pelos grupos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou

que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as probabilidades [$F(1, 11) = 0.100$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$], nem ao comparar as probabilidades nos diferentes grupos de animais [$F(2, 11) = 0.368$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$], e nem ao comparar as probabilidades nas diferentes fases do ciclo reprodutivo [$F(2, 22) = 0.955$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$]. Interação entre grupos, fases do ciclo e probabilidade também não foi encontrada [$F(4, 22) = 0.767$; $p > 0.05$; $\omega^2 < 0.001$]. Esses dados sugerem que a probabilidade média experienciada pelos animais na alternativa LR foi estatisticamente semelhante à probabilidade programada.

Apesar de ter sido verificado que a probabilidade média programada e a probabilidade média real experienciada foi semelhante entre todos os grupos, a Figura 2.4 mostra uma variabilidade intra-grupo entre os sujeitos nessas duas medidas. A Figura 2.5 apresenta, então, os dados dos sujeitos individuais, relacionando a probabilidade experienciada em LR quando o IP foi atingido (eixo y) e a probabilidade programada (eixo x). Pontos sobre a linha teórica traçada indicam que ambas, probabilidade programada e experienciada, coincidiram; pontos abaixo da curva indicam que os animais experienciaram uma probabilidade menor que a programada (tiveram um número de entradas bem-sucedidas menor que o programado) e pontos acima da linha indicam que a probabilidade experienciada foi maior que a programada.

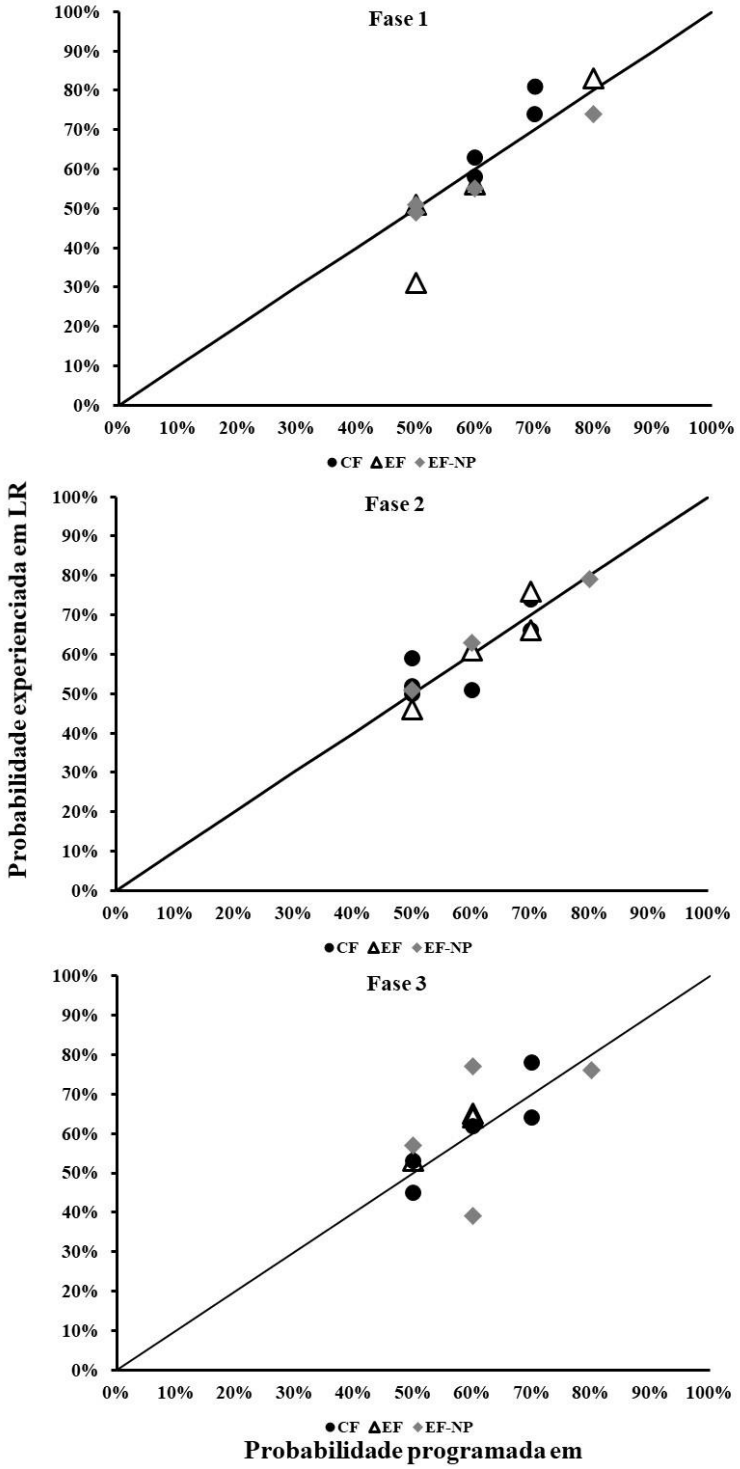

Figura 2.5. Probabilidade experienciada em função da probabilidade programada em LR estabelecida em cada fase do experimento, fêmeas controle (CF), fêmeas experimentais (EF) e fêmeas experimentais que não engravidaram (EF-NP). A linha sólida representa os pontos em que os valores do eixo x e y coincidem.

Durante a fase de pré-gestação (Fase 1) observa-se que a probabilidade experienciada pelos animais no ponto de indiferença, de modo geral, coincidiu com a probabilidade programada, com exceção de uma fêmea EF (abaixo da linha) e uma fêmea CF (pouco acima da linha). No período de gestação (Fase 2), os dados de todas as fêmeas ficam em torno da linha teórica, indicando que a probabilidade programada coincidiu com a experienciada. No período de lactação, porém (Fase 3), observa-se maior variabilidade dos dados, especialmente entre as fêmeas do grupo EF-NP: os dados de duas delas ficaram acima da linha teórica, e os de uma ficaram bem abaixo da linha. Os pontos referentes às fêmeas experimentais (EF) assim como os dados da maioria das fêmeas CF, se ajustaram em torno da linha teórica, com uma exceção (CF) acima da linha teórica. Apesar de não terem sido encontradas diferenças com relação à probabilidade programada e a probabilidade real experienciada entre as 14 fêmeas, cerca de cinco (duas CF, duas EF e uma EF-NP) apresentaram a probabilidade experienciada acima de 70% em pelo menos uma fase do ciclo reprodutivo. As demais (a maioria) atingiram pontos de indiferença em probabilidades (real e experienciada) em LR menores que 70%, aquela em que LR era, de fato, a alternativa mais vantajosa.

O número de pelotas possíveis de serem consumidas e a quantidade de pelotas efetivamente consumida pelos animais na alternativa LR foi calculado com base nas três últimas sessões de cada fase do estudo, e o resultado é apresentado na Figura 2.6.

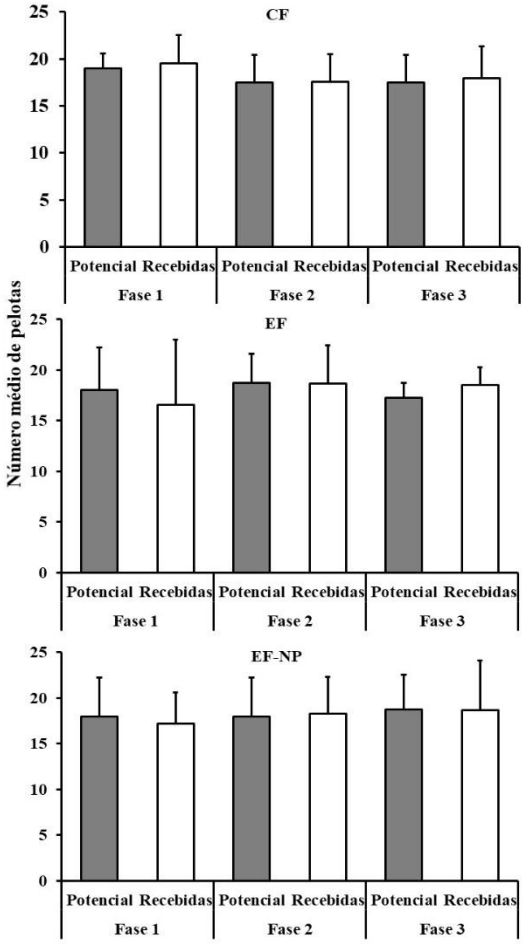

Figura 2.6. Número médio de pelotas de ração programadas para serem liberadas (Potencial) em LR e efetivamente recebidas (Recebidas) pelo grupo de fêmeas controles (CF), experimentais (EF), e experimentais que não engravidaram (EF-NP) nas diferentes fases do experimento, durante as três últimas sessões de cada fase. As barras cinzas indicam a quantidade de pelotas que os animais poderiam segundo a probabilidade programada, na alternativa LR. As barras brancas indicam quantas pelotas, no total, os animais receberam ao escolher LR. S.E.M. n=6 para os grupos de fêmeas controles e n=4 para o cada grupo de fêmeas experimentais.

Observa-se na Figura 2.6 que, em média, o consumo real de pelotas de ração foi próximo ao programado na alternativa LR. Esse dado mostra que, independentemente da fase do ciclo estral, das fases experimento, que foi dividido de acordo com as fases do ciclo reprodutivo das fêmeas experimentais e da condição nutricional, a probabilidade experienciada pelos animais foi, em média, próxima à programada.

Discussão

O objetivo geral do Estudo 2 foi verificar se o ponto de indiferença em uma tarefa de escolha probabilística poderia variar ao longo das fases do ciclo reprodutivo em um grupo de fêmeas submetidas a um procedimento de privação alimentar, em comparação a fêmeas controles (não privadas). O Estudo 1 indicou que, em condições suficientes de alimentação, as diferentes fases do ciclo reprodutivo não se mostraram uma variável capaz de alterar o ponto de indiferença entre uma alternativa probabilística com maior quantidade de alimento (LR) e uma alternativa com menor quantidade de alimento, porém segura (SS). A hipótese testada no Estudo 2 era de que a privação alimentar, associada às diferentes fases do ciclo reprodutivo em fêmeas, poderia produzir alterações nesse ponto de indiferença. Sob condições de acesso limitado à alimentação e em fase de gestação e amamentação, fêmeas poderiam tender a arriscar mais por uma quantidade maior de alimento, atingindo ponto de indiferença em probabilidades menores na alternativa LR do que fêmeas controle. Os resultados deste estudo não confirmaram essa hipótese.

Os resultados obtidos sugerem que, nas condições testadas, o ciclo reprodutivo e a condição nutricional a que os animais foram submetidos não interferiram no estabelecimento do ponto de indiferença das fêmeas. As fêmeas de todos os grupos estabeleceram o IP quando a probabilidade de obter reforço estava em média entre 50% e 70%, e essa probabilidade foi mantida ao longo de todo o procedimento.

O Estudo 2 confirma os resultados obtidos no Estudo 1 sobre a ausência de variações no IP em diferentes fases do ciclo reprodutivo de fêmeas. A hipótese de que variações hormonais podem interferir no comportamento de fêmeas têm sido testada em diferentes estudos. Parte deles tem voltado sua atenção para o entendimento de como hormônios, que variam com muita frequência ao longo dos dias em fêmeas, podem promover alterações comportamentais. De modo geral, esses estudos apontam que, dependendo da fase do ciclo

estral e de certas condições ambientais, ratas (*R. norvegicus*) podem expressar resposta de medo (Lovick, 2014; Milad, Lebron-Milad, & Novales, 2009) ou de ansiedade (Devall, Santos, & Lovick, 2011; Gouveia Júnior & Morato, 2002), por exemplo. A influência da variação do ciclo estral, no entanto, não foi verificada em estudos sobre comportamento de escolha em situações de risco, da mesma forma que no presente estudo (Orsini et al., 2016; van den Bos et al, 2012). Orsini et al. (2016), por exemplo, expuseram fêmeas Long-Evans a uma tarefa em que poderiam escolher entre uma alternativa com pequena quantidade de comida (1 pelota) obtida de forma segura (alternativa SS) e uma alternativa com maior quantidade de comida (2 pelotas), mas que poderia ser acompanhada de um leve choque. Os autores verificaram que o padrão de escolha das fêmeas não foi modulada pelas diferentes fases do ciclo estral. Nesse sentido, o Estudo 2 avança ao replicar os achados do Estudo 1 de que, não apenas as diferentes fases do ciclo estral não se mostraram uma variável capaz de alterar o padrão de escolha das fêmeas na fase pré-gestacional, mas que também as condições de gestação e lactação não afetaram o padrão de escolha das fêmeas e nem as fases do ciclo estral.

A segunda variável investigada no Estudo 2, a privação alimentar, também não se mostrou relevante na determinação do IP entre as alternativas apresentadas, comparando-se os grupos privado e não privado. As fêmeas do grupo experimental foram mantidas a 75% do peso *ad lib*. A restrição alimentar imposta às fêmeas desse grupo produziu efeitos que puderam ser observados, tanto na diferença de peso entre os grupos experimental e controle, quanto no fato de que metade das fêmeas do grupo experimental não conseguiu passar pela fase de gestação, a despeito das tentativas realizadas.

Várias pesquisas têm mostrado que a privação alimentar faz com que os animais tenham dificuldade para se reproduzir e é comum que fêmeas sob regime de privação alimentar não engravidem (Kajiyama, Matto, Silva, Annunciato, & Marques, 1982; Mazeti &

Furlan, 2008; Merry & Holehan, 1979). Mazeti e Furlan (2008) descrevem que ratas em regime de restrição alimentar podem não engravidar por não aceitarem a cópula, por não haver fertilização dos óvulos após o acasalamento, ou porque os óvulos foram fertilizados, mas a gestação não prosseguiu. Na presente pesquisa, é possível que os óvulos das fêmeas do grupo EF-NP não tenham sido fertilizados ou que a gestação não tenha se efetivado. Na análise das lâminas de acompanhamento do ciclo estral foi possível identificar claramente a ocorrência da fase do estro nessas fêmeas, e também a presença de espermatozóides, o que indica que a cópula ocorreu. Alguns estudos apontam, ainda, que quando fêmeas de roedores passam por períodos de restrição alimentar, é possível observar redução do tamanho do ovário, da concentração de estradiol e o prolongamento da fase de diestro, resultando em redução do corpo lúteo e infertilidade (Dulloo & Girardier, 1993a; Liang & Zhang, 2006).

Ratos sob restrição alimentar, com acesso a poucas porções diárias e com peso abaixo do normal podem apresentar, ainda, alterações neurobiológicas, no quadro hormonal e no gasto energético (Even & Nicolaidis, 1993; Houdijk, Engelbregt, Popp-Snijders, & Delemarre van der Waal 2003). Nessas condições a sobrevivência dos sujeitos que passam por períodos prolongados de restrição alimentar fica sujeita à readequação fisiológica dos indivíduos, que pode envolver a diminuição da atividade motora para economia energética e a alteração de certas funções. Em termos evolutivos, a gravidez e a lactação podem não ser vantajosas em um ambiente com escassez de alimentos, representando risco de morte para a fêmea, uma vez que nesses períodos o gasto energético é maior. Todos esses aspectos (a diferença de peso entre o grupo controle e o experimental e o fato de que quatro fêmeas do grupo experimental não engravidaram) sugerem que a privação à qual as fêmeas do grupo EF foram submetidas (tanto as que engravidaram como as que não engravidaram) produziu mudanças que tornaram, de fato, os dois grupos diferentes. Com isso, descarta-se uma eventual objeção de que a ausência de diferenças entre os grupos no padrão de escolhas possa

ter ocorrido em função de ausência de efeitos da privação sobre os animais do grupo experimental.

O resultado mais importante do Estudo 2 refere-se ao fato de que a privação, associada às diferentes fases do ciclo reprodutivo, não teve efeitos sobre o estabelecimento do IP entre as alternativas disponíveis. Efeitos da privação sobre o comportamento de escolha de animais não humanos têm sido investigados por diversos autores, mas os resultados dessas pesquisas têm sido variáveis.

Alguns estudos verificaram que a privação alimentar pode fazer com que animais apresentem respostas impulsivas em procedimentos de escolha, a depender da condição nutricional ao qual foram submetidos (Eisenberger, Masterson & Lowman, 1982; Snyderman, 1983). Eisenberger et al. (1982, Experimento 2) por exemplo, verificaram que maiores níveis de privação podem fazer com que ratos tendam a escolher alternativas com menor quantidade de comida (uma pelota), mas entregue com um pequeno atraso (1s - SS), em comparação a alternativas com quantidades maiores de alimento (sete pelotas), mas entregues com atraso (32s - LL), especialmente quando o atraso é longo (em atrasos pequenos, essa tendência não foi observada – uma pelota entregue com 1s de atraso vs. três pelotas entregues com 12s de atraso). Prince et al. (2020) expuseram ratos machos a um procedimento de escolha entre uma alternativa SS (uma pelota de alimento) e uma alternativa LL (cinco pelotas) em duas condições: privados a 85% do peso ad lib, ou com acesso livre à comida. Nessas condições, os animais privados fizeram mais escolhas pela alternativa LL em comparação aos animais não privados.

Hastjarjo e Silberberg (1992) também compararam a escolha de ratos entre alternativas SS e LL, porém manipularam o número de tentativas às quais os animais foram expostos em cada sessão, o que implicava na quantidade de alimento que eles poderiam obter em uma sessão: em uma das condições (*high income*) os animais tinham 100 tentativas livres

para escolher, enquanto que na segunda condição (*low income*) os animais tinham entre 60 e 70 tentativas por sessão para obter alimento. Os pesquisadores observaram que na condição *low income* a porcentagem de escolhas pela alternativa LL aumentou em comparação à condição *high income*. Apesar de não ter sido manipulado o estado de privação dos animais, o experimento manipulou a disponibilidade de alimento para o animal, uma vez que a sessão experimental era a única oportunidade de alimentação diária dos sujeitos.

Nos três estudos citados observa-se que a condição manipulada era o atraso na alternativa mais vantajosa (LL). No estudo de Eisenberger et al. (1982) e no de Prince et al. (2020) a privação se mostrou uma variável relevante no comportamento de escolha dos animais privados. Eisenberger et al. verificaram que a espera pela porção maior de alimento passou a ser aversiva a partir de um ponto determinado (conseguir uma quantidade menor de alimento era melhor que esperar para tê-lo em maior quantidade), o que favoreceu a escolha pela alternativa SS. No estudo de Prince et al., a magnitude do reforçador na alternativa LL pode ter modulado a aversividade do seu atraso. No estudo de Hastjarjo e Silberberg (1992), por outro lado, a condição *low income* reduzia a possibilidade do animal obter o alimento necessário à sua manutenção, o que fez com que o atraso para obtenção do alimento fosse menos aversivo em comparação à condição *high income* (esperar para obter o alimento necessário era melhor que obter uma quantidade talvez insuficiente de alimento).

Outros estudos, porém, não têm encontrado alterações no desempenho de animais não humanos (ratos e pombos) submetidos a procedimentos de privação alimentar em tarefas de escolhas (Ho et al., 1997; Logue, Chavarro, Rachlin & Szabadi, 1988; Logue & Penal-Correal, 1985; Oliveira et al., 2013; Ostaszewski, Karzel & Szafranska, 2003). Todos esses estudos utilizaram o modelo de *delay discounting*, segundo o qual o atraso para obtenção de um reforçador “desconta” o seu valor subjetivo. Na presente pesquisa, que utilizou um modelo de alternativa probabilística, também não foi possível verificar influência da privação

alimentar no comportamento de escolha, de forma a alterar o ponto de indiferença ao longo do ciclo reprodutivo, favorecendo a ideia de que talvez outras variáveis, como o tipo de delineamento utilizado ou a magnitude do reforço nas alternativas, tenham um efeito maior sobre a escolha e possam explicar as diferenças encontradas nos estudos.

Autores como Ho et al. (1997) e Oliveira et al. (2013), por exemplo, têm argumentado que um dos principais fatores que contribuem para os diferentes dados encontrados em estudos sobre escolha e sua relação com a privação alimentar, são os diferentes tipos de procedimento empregados. Ho et al. (1997), afirmam que essa diferença entre os procedimentos realizados, acaba tornando a comparação entre estudos inapropriada. Como pode ser visto na literatura, existem diferentes modelos de estudo do comportamento de escolha, incluindo ou não variáveis de risco, como probabilidade para obtenção do reforço (Wallin-Miller, Chesley, Castrillon e Wood, 2017), atraso para obtenção do reforço (Mazur, 1988b; Rachlin & Green, 1972), manipulação da magnitude do reforço (Richards, Mitchell, Wit, & Seiden, 1997; Oliveira et al., 2013), risco de punição ao escolher uma determinada alternativa (van den Bos et al., 2012; Orsini et al., 2016), diferentes níveis de privação alimentar (Ho et al., 1997; Ostaszewski et al., 2013) dentre outros. Além disso, a utilização de animais de diferentes espécies, como já apontado por alguns estudos (Mazur, 2004; Mazur & Biondi, 2011; Oliveira et al., 2013), pode contribuir para a produção do desenvolvimento de diferentes resultados obtidos nas pesquisas.

Nesse sentido, compreender as diferenças em resultados de pesquisa sobre escolha e privação alimentar pode depender de um exercício de análise desses procedimentos, na medida em que a combinação de certas condições (quantidade de reforçador, probabilidade e atraso para sua obtenção) são fatores cruciais na determinação das escolhas dos sujeitos e a combinação desses fatores torna a sua previsão muito mais difícil (Oliveira et al., 2013). O primeiro ponto a ser considerado é a variável aplicada na tentativa mais vantajosa (com maior

quantidade de reforçadores). Como visto anteriormente, a maioria das pesquisas que estudam o efeito da privação no comportamento de escolha introduz um atraso na alternativa com maior quantidade de reforçador (*delay discounting*). Nesse caso o atraso produziria um "desconto" no valor subjetivo do reforçador (ele se tornaria menos "atraente" para o sujeito). A literatura é farta em dados que mostram que o aumento dos valores do atraso aplicado à alternativa com maior quantidade de reforçadores produz a diminuição da preferência por essa alternativa (Green & Myerson, 2004; Green, Myerson, & Vanderveldt, 2014; Rachlin & Green, 1972; Richards, Mitchell, De Wit, & Seiden, 1997). No caso de indivíduos sob restrição alimentar, a pergunta é se os animais privados escolheriam mais frequentemente esperar para ter acesso a uma quantidade maior de alimento, ou se apresentariam uma escolha chamada na literatura de "impulsiva" (Ainslie, 1975; Perry, Larson, German, Madden, & Carroll, 2005), escolhendo preferencialmente a alternativa imediata, em comparação a animais sem restrição alimentar. Nas pesquisas revisadas a privação pareceu ter efeitos sobre o comportamento de escolha dos sujeitos em apenas duas condições. Quando o valor do atraso era aumentado (Eisenberger et al., 1982), os animais privados tendiam a preferir a alternativa SS em comparação aos animais não privados. Porém, quando a diferença na magnitude do reforçador entre as alternativas SS e LL era significativa (2 vs. 5 pelotas), a quantidade de alimento obtido na alternativa mais vantajosa parece ter compensado o atraso, fazendo com que os animais privados persistissem mais na alternativa LL em comparação aos animais não privados (Prince et al., 2020). Essas condições não estavam presentes nas pesquisas que não encontraram diferenças entre grupos de ratos com e sem restrição alimentar (Ho et al., 1997; Logue e Peña-Correal, 1985; Ostaszewski et al., 2003). De modo geral, esses estudos utilizavam uma quantidade fixa de pelotas nas alternativa (1 vs. 2; 2 vs. 5 pelotas), e havia um atraso para a obtenção do reforço maior, o qual poderia ser variável, dependendo do objetivo da pesquisa.

Apesar de autores como Rachlin, Logue, Gibbon e Franfel (1986) argumentarem que reforçadores atrasados podem ser funcionalmente equivalentes a reforçadores probabilísticos, uma vez que tentativas “malsucedidas” necessariamente geram um atraso até a ocorrência de uma tentativa “bem-sucedida”, essa equivalência não é simples, tampouco direta (Mazur, 2004). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo não podem ser comparados de forma direta às demais pesquisas revisadas, uma vez que os procedimentos adotados foram diferentes, e não foram encontrados outros estudos que investigassem os efeitos da privação em tarefas de escolha probabilística. No entanto, como será visto adiante, é possível que a diferença entre a magnitude dos reforçadores nas alternativas, discutida por Prince et al. (2020) possa ser analisada como uma variável relevante para se compreender os resultados do presente estudo.

Outra questão a ser considerada na presente pesquisa é o aparato utilizado. Enquanto a maioria das pesquisas aqui discutidas utilizam caixas de condicionamento operante, nas quais as escolhas podem ser feitas por meio de pressões a barras dispostas lado a lado, no estudo aqui apresentado foi utilizado um labirinto. Para realizar a escolha, o animal deveria percorrer dois corredores até acessar o comedouro da alternativa escolhida, o que certamente tem um custo de resposta maior do que alcançar uma barra disposta na parede de uma câmara experimental, especialmente em se tratando de animais privados de alimento ou grávidas. Além disso, é preciso considerar que, além do esforço em percorrer o labirinto, o tempo gasto para o acesso ao comedouro é acrescido ao intervalo entre as tentativas (ITI), o que pode ser relevante na análise de resultados de estudos sobre escolha (Mazur, 2004). Não é possível, no entanto, determinar se, e quanto, o custo de resposta de escolha pode ter diminuído o valor da alternativa LR nas condições aqui estudadas, nem sua relevância na determinação dos resultados obtidos.

A ausência de diferenças entre o grupo controle e o grupo experimental neste estudo, mesmo em condições de gravidez e lactação, que exigem maior aporte energético nas fêmeas, talvez possa ser entendido a partir de algumas hipóteses. A primeira delas refere-se ao fato de que a privação alimentar pode ter influenciado outros aspectos do responder dos sujeitos (Logue et al., 1988). A privação alimentar pode alterar o gasto energético do animal ao longo do dia de forma que dentro da caixa viveiro o animal passe a economizar sua energia, passando menos tempo se locomovendo, por exemplo (Dulloo & Girardier, 1993b; Even & Nicolaidis, 1993). Alguns estudos apontam que animais privados exibem menor movimentação nos períodos em que não são alimentados em comparação ao grupo controle, e ingerem o alimento de forma mais rápida, enquanto que animais com dieta ad lib. demoram períodos maiores para terminar de ingerir a porção de alimentos (Cambras, Vilaplana & Diez-Noguera, 1993; Mazeti & Furlan, 2008; Santos-Pinto & J. Luz, 2001). Esse é um fator que deve ser controlado em futuras pesquisas, pois, por um lado, o gasto energético pode representar um risco de morte para os animais, podendo estar relacionado ao fato de algumas fêmeas não terem engravidado. Por outro lado, a diminuição da atividade do animal, com consequente economia de energia, pode ter amenizado os efeitos da privação, interferindo no desempenho dos animais ao longo do procedimento.

A segunda hipótese para a ausência de diferenças entre os grupos experimental e controle pode estar relacionada à quantidade de pelotas de alimento disponíveis nas duas alternativas (e à proporção entre elas). Como visto anteriormente (Estudo 1), a maioria das pesquisas que estuda os efeitos da privação sobre o comportamento de escolha em tarefas de *delay discounting* utiliza proporções semelhantes àquelas utilizadas no presente estudo. A proporção, assim como a quantidade de alimento, pode ter um valor maior para indivíduos que passam por privação alimentar. Prince et al. (2020) mostram isso em seu estudo, em que a alternativa SS liberava uma pelota de ração e a LL, 5 pelotas depois de um atraso variável

(0 à 60 s). Quando mantido a 85% do seu peso ad lib. os animais escolheram com maior frequência a alternativa LL do que quando foram mantidos com seu peso livre. Nesse estudo a quantidade de comida sempre foi constante, apenas o atraso para obtenção da reforço maior aumentava. Os autores destacam o efeito da magnitude do reforço no comportamento de escolha dos animais do grupo em privação alimentar, mostrando que provavelmente a maior magnitude do reforçador tende a diminuir o desconto causado pelo atraso na sua obtenção. Nesse sentido, a maior quantidade de alimento na alternativa LL tende a compensar o atraso. Além disso, a quantidade pequena de alimento presente na alternativa SS tende a ter um efeito contrário.

O estudo de Mazur (1988a), em um estudo com alternativas probabilísticas, sustenta o dado apresentado por Prince et al. sobre o efeito da magnitude do reforço. Quando o autor destaca que a proporção de reforço entre as alternativas (e.g., o dobro ou o triplo) é menos importante que a quantidade absoluta de alimento presente em cada uma (e.g., 2 vs 4 e 4 vs 8 pelotas), sugere que 4 pelotas pode parecer muito em relação a 2, mas que 8 pelotas pode não parecer tanto, uma vez que a alternativa segura apresenta uma quantidade também grande de alimento disponível (4). De certo modo isso significa que o quão “atraente” a alternativa LL pode parecer depende muito da quantidade de alimento disponível na alternativa segura, como também destacado por Zoratto et al. (2016).

Assim como no Estudo 1, é possível que a quantidade de ração disponível nas diferentes alternativas nesse Estudo 2 não tenha sido suficiente para fazer com que as fêmeas experimentais, sobretudo as que engravidaram, aumentassem ou diminuíssem sua escolha pela alternativa LR, depois que o ponto de indiferença foi estabelecido. A diferença entre as alternativas pode ter feito com que a alternativa LR não fosse tão “atraente” a ponto de fazer com que as fêmeas, com maior necessidade de aporte calórico durante a gravidez e a lactação, arriscassem mais nessa alternativa para obter maior porção de alimento. Ou, talvez

as fêmeas tenham aprendido a variar suas respostas entre as alternativas de modo a garantir que receberiam uma quantidade suficiente de ração para sua sobrevivência. Se a exposição contínua dos animais ao procedimento experimental fez com que eles aprendessem que, ao distribuir mais ou menos igualmente as escolhas entre as alternativas quando a probabilidade em LL era de 50 a 70% de probabilidade, conseguiriam obter quantidade de ração suficiente para manter sua sobrevivência e energia, não faria sentido mudar o IP e arriscar obter quantidades menores de alimento.

Segundo Kamil e Roitblat (1985), apenas quando um ambiente não é previsível, um animal deve gastar energia e investigar as chances de um forrageio bem-sucedido naquele ambiente. Pode-se somar a esse fator uma possível habituação ao nível de privação, a diminuição do gasto energético fora das sessões experimentais (como sugerido anteriormente) e o fato de que a quantidade de alimento extra sessão era suficiente para a sua sobrevivência. É possível sugerir que talvez a privação de fato tenha influência no comportamento de escolha de fêmeas em diferentes fases do ciclo reprodutivo quando essa privação de fato coloca-la em risco ou quando condições realmente vantajosas possam fazê-la se arriscar mais do que em uma situação de acesso livre à comida. De acordo com Kamil e Roitblat quando os animais estão em um ambiente com boas condições de alimentação e o benefício médio das alternativas de escolha no ambiente é suficiente para atender suas necessidades energéticas, então a escolha pela alternativa variável pode aumentar as chances de risco de fome, caso o animal escolha uma série de vezes a alternativa sem alimento. Porém, se o animal está inserido em uma condição de desnutrição, e o benefício médio disponível no ambiente for ruim, então vale a pena apostar na alternativa variável, uma vez que uma sequência de disponibilidade de alimento pode reduzir a fome. O conjunto desses fatores pode ter contribuído para que, nas condições experimentais testadas, não tenham sido encontradas diferenças entre os grupos.

Independentemente da ausência de diferenças entre os grupos, é importante destacar que a maioria dos animais atingiu o ponto de indiferença quando a probabilidade em LR era menor que 70%, situação em que essa alternativa era desvantajosa em comparação à alternativa SS. Esse dado, assim como discutido no estudo anterior, sustentam a ideia de que a escolha dos animais estavam mais sob controle da quantidade de pelotas disponíveis nas alternativas do que pela probabilidade de obter ou não as pelotas de ração. A probabilidade pode ter influenciado as escolhas dos animais apenas para o estabelecimento inicial do IP, mas conforme as fêmeas foram passando pelo período de gestação e lactação, e o ambiente continuava estável (mesma probabilidade de obter o reforço, e mesma quantidade de pelotas disponível entre as alternativas), não faria sentido os animais variarem suas escolhas. Talvez se outras proporções fossem utilizadas, ou variações na quantidade de reforço, e situações de risco explícita fossem inseridas nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, diferentes IPs poderiam ser observados ao longo das sessões experimentais.

Algumas limitações devem ser ponderadas no presente estudo. Entre elas, destaca-se o número de fêmeas experimentais que engravidaram, em comparação ao número de fêmeas controle. O pareamento numérico desses grupos poderia dar indicadores mais seguros da ausência de diferença entre as condições estudadas. Além disso, esse estudo, assim como o Estudo 1, testou apenas uma condição de privação (75% do peso ad lib) e a mesma variação de número de pelotas de ração disponíveis em cada alternativa (2 vs. 3 pelotas). Por se tratar de um estudo exploratório, não seria possível fazer todas as variações necessárias para se afirmar com segurança que o estado de privação não tem influência na escolha entre alternativas probabilísticas, mas essas variações devem ser abordadas em estudos futuros. A despeito dessas limitações, resultados relevantes foram obtidos nessa pesquisa.

O estudo realizado mostrou que fêmeas, independentemente de terem passado por restrição alimentar ou não, são influenciadas pelas suas necessidades energéticas; o

custo/benefício é também um fator importante quando estão diante de tarefas de escolha envolvendo risco para a obtenção de alimento, mesmo quando estão em período gestacional ou lactantes. Os resultados encontrados sugerem que a privação alimentar não influenciou na escolha dos animais, nem mesmo em diferentes fases do ciclo reprodutivo, dentro das condições testadas. Futuras pesquisas devem aprofundar investigações sobre o comportamento de escolha em gestantes e lactantes, verificando/controlando o gasto energético das fêmeas ao longo do dia, expondo os animais a diferentes magnitudes de reforço entre as alternativas, e verificando se procedimentos que envolvem alternativas probabilísticas podem produzir resultados diferentes daqueles envolvendo atraso. Esses resultados reafirmam a importância de se estudar o ciclo reprodutivo como uma variável biológica que afeta o comportamento de fêmeas, para o entendimento das espécies, inclusive em relação a aspectos evolutivos.

Referências

Ainslie, G. W. (1974). Impulse control in pigeons 1. *Journal of the experimental analysis of behavior, 21*(3), 485-489. https://doi.org/10.1901/jeab.1974.21-485

Almeida, S. S., de Oliveira, L. M., & Graeff, F. G. (1990). Decreased reactivity to anxiolytics caused by early protein malnutrition in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 36*(4), 997-1000. https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90113-V

Andreano, J. M., & Cahill, L. (2009). Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learning & memory, 16*(4), 248-266. https://doi.org/10.1101/lm.918309

Azeredo, V. B. D., Dias, M. M., Boaventuara, G. T., Caro, M. D. G. T. D., & Fernandes, N. R. (2003). Influência da multimistura na gestação de ratas: pesos materno e fetal e triglicerídeos séricos. *Revista de Nutrição, 16*(1), 83-91. https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000100009

Barbosa, E. H., Soares, R. O., Braga, N. N., Almeida, S. D. S., & Lachat, J. J. (2015). Effects of environmental enrichment on blood vessels in the optic tract of malnourished rats: A morphological and morphometric analysis. *Nutritional Neuroscience, 19*(5), 224-230. https://doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000013

Bateson, M. (2002a). Context-dependent foraging preferences in risk sensitive starlings. *Animal Behavior, 64*(2), 251-260. https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3059

Bateson, M. (2002b). Recent advances in our understanding of risk-sensitive foraging preferences. *Proceedings of the Nutrition Society, 61*(4), 509-516. https://doi.org/10.1079/PNS2002181

Bateson, M., Healy, S. D., & Hurly, T. A. (2002). Irrational choices in hummingbird foraging behaviour. *Animal Behaviour, 63*(3), 587-596. https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1925

Baum, W. M. (1974). On two types of deviation from the matching law: bias and undermatching. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 22*(1), 231-242. https://doi.org/10.1901/jeab.1974.22-231

Baum, W. M. (1979). Matching, undermatching, and overmatching in studies of choice. *Journal of the Experimental analysis of Behavior, 32*(2), 269-281. https://doi.org/10.1901/jeab.1979.32-269

Bauman, D. E., & Currie, W. B. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science, 63*(9), 1514-1529. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83111-0

Beery, A. K., & Zucker, I. (2011). Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 35*(3), 565-572. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002

Ben-Jonathan, N. I. R. A., Oliver, C., Weiner, H. J., Mical, R. S., & Porter, J. C. (1977). Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy 1. *Endocrinology, 100*(2), 452-458. https://doi.org/10.1210/endo-100-2-452

Bjorklund D. F., Kipp K. (1996). Parental investment theory and gender differences in the evolution of inhibition mechanisms. *Psychological Bulletin, 120*(2), 163–188. https://doi.org/10.1037/0033-2909.120.2.163

Brandão, M. L. (2004). *As bases biológicas do comportamento: Introdução a neurociência.* São Paulo: EPU.

Butcher, R. L., Collins, W. E., & Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology, 94*(6), 1704-1708. https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1704

Cambras, T., Vilaplana, J., & Diez-Noguera, A. (1993). Effects of long-term restricted feeding on motor activity rhythm in the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *265*(2), R467-R473. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.2.R467

Caraco, T. (1981). Energy budgets, risk and foraging preferences in dark-eyed juncos (Junco hyemalis). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *8*(3), 213-217. https://doi.org/10.1093/beheco/10.3.338

Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição*. Porto Alegre: Artmed.

Chowdhury, T. G., Wallin-Miller, K. G., Rear, A. A., Park, J., Diaz, V., Simon, N. W., & Moghaddam, B. (2019). Sex differences in reward-and punishment-guided actions. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, *19*(6), 1404-1417. https://doi.org/10.3758/s13415-019-00736-w

Cirilo, S. T. (2016) Comportamento de escolha em ratos Sprague Dawley (Rattus norvegicus) sob restrição alimentar. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

De Mello, M. A. R., Luciano, E., & Correa, A. F. (2008). Exercício em ratas jovens grávidas portadoras de desnutrição protéica: Efeitos sobre o metabolismo glicídico. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, *10*(2), 55-62.

Devall, A. J., Santos, J. M., & Lovick, T. A. (2011). Estrous cycle stage influences on neuronal responsiveness to repeated anxiogenic stress in female rats. *Behavioural Brain Research*, *225*(1), 334-340. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.038

Dial, J., & Avery, D. D. (1991). The effects of pregnancy and lactation on dietary self-selection in the rat. *Physiology & Behavior*, *49*(4), 811-813. https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90322-F

Donovan, C. H., Wong, S. A., Randolph, S. H., Stark, R. A., Gibb, R. L., & Gruber, A. J. (2018). Sex differences in rat decision-making: The confounding role of extraneous feeder sampling between trials. *Behavioural Brain Research, 342,* 62-69. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.01.018

Dulloo, A. G., & Girardier, L. (1993a). 24 hour energy expenditure several months after weight loss in the underfed rat: Evidence for a chronic increase in whole-body metabolic efficiency. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity, 17*(2), 115-123.

Dulloo, A.G., & Girardier, L. (1993b). Adaptive role of energy expenditure in modulating body fat and protein deposition during catch-up growth after early undernutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition, 58*(5), 614-621. https://doi.org/10.1093/ajcn/58.5.614

Eisenberger, R., Masterson, F. A., & Lowman, K. (1982). Effects of previous delay of reward, generalized effort, and deprivation on impulsiveness. *Learning and Motivation, 13*(3), 378-389. https://doi.org/10.1016/0023-9690(82)90016-9

Eliasson, M., & Meyerson, B. J. (1975). Sexual preference in female rats during estrous cycle, pregnancy and lactation. *Physiology & Behavior, 14*(6), 705-710. https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90061-X

Even, P. C., & Nicolaidis, S. (1993). Adaptive changes in energy expenditure during mild and severe feed restriction in the rat. *British Journal of Nutrition, 70*(2), 421-431. https://doi.org/10.1079/BJN19930136

Finger, S., Almli, C. R., Green, L., Wolf, C., & Morgane, P. J. (1986). Severe early malnutrition and DRL performance in the rat. *Physiology & Behavior, 38*(5), 731-734. https://doi.org/10.1016/0031-9384(86)90271-4

Freeman, E. W., Rickels, K., Sondheimer, S. J., Denis, A., Pfeifer, S., & Weil, S. (1994). Nefazodone in the treatment of premenstrual syndrome: A preliminary study. *Journal of Clinical Psychopharmacology, 14*(3), 180–186. https://doi.org/10.1097/00004714-199406000-00005

Gilby, I. C. & Wrangham, R. W. (2007). Risk-prone hunting by chimpanzees (Pan troglodytes schweinfuthii) increases during periods of high diet quality. *Behavioral Ecology and Sociobiology, 61*(11), 1771-1779. https://doi.org/10.1007/s00265-007-0410-6

Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 80*(2), 84-97. https://doi.org/10.1002/bdrb.20106

Gouveia Júnior, A., & Morato, S. (2002). Influências do ciclo estral sobre o desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia, 6*(2). https://doi.org/10.5380/psi.v6i2.3301

Green, L., & Myerson, J. (2004). A discounting framework for choice with delayed and probabilistic rewards. *Psychological bulletin, 130*(5), 769. https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.5.769

Green, L., Myerson, J., & Vanderveldt, A. (2014). *Delay and probability discounting.* In F. K. McSweeney & E. S. Murphy (Eds.), *The Wiley Blackwell handbook of operant and classical conditioning* (p. 307–337). Wiley-Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781118468135.ch13

Haaren, F. V., Hest, A. V., & Poll, N. E. (1988). Self-control in male and female rats. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 49*(2), 201-211. https://doi.org/10.1901/jeab.1988.49-201

Hanna, E. S. & Ribeiro, M. R. (2005). Auto-controle: Um caso especial de comportamento de escolha. In J. Abreu-Rodrigues & M. R. Ribeiro (Org.) *Análise do Comportamento: Pesquisa, Teoria e Aplicação* (pp. 175-188). Porto Alegre: Artmed.

Hastjarjo, T., & Silberberg, A. (1992). Effects of reinforcer delays on choice as a function of income level. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 57*(1), 119-125. https://doi.org/10.1901/jeab.1992.57-119

Hastjarjo, T., Silberberg, A., & Hursh, S. R. (1990). Risky choice as a function of amount and variance in food supply. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 53*(1), 155-161. https://doi.org/10.1901/jeab.1990.53-155

Hebel, R., & Stromberg, M. W. (1986). Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag. Worthsee, Germany.

Herrnstein, R. J. (1961). Relative and absolute strength of responses as a function of frequency of reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 4*(3), 267-272. https://doi.org/10.1901/jeab.1961.4-267

Herrnstein, R. J. (1970). On the law of effect. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 13*(2), 247-278. https://doi.org/10.1901/jeab.1970.13-243

Ho, M. Y., Wogar, M. A., Bradshaw, C. M., & Szabadi, E. (1997). Choice between delayed reinforcers: Interaction between delay and deprivation level. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology: Section B, 50*(3), 193-202. https://doi.org/10.1080/713932652

Houdijk, M. E., Engelbregt, M. T., Popp-Snijders, C., & Delemarre van der Waal, H. A. (2003). Long-term effects of early postnatal food restriction on growth hormone secretion in rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 27*(4), 260-267. https://doi.org/10.1177/0148607103027004260

Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry, 80*(2), 79-87. https://doi.org/10.1080/10520290500138422

Hughes, R. N. (1968). Behaviour of male and female rats with free choice of two environments differing in novelty. *Animal Behaviour, 16*(1), 92-96. https://doi.org/10.1016/0003-3472(68)90116-4

Kacelnik, A., & Bateson, M. (1996). Risky theories: The effects of variance on foraging decisions. *American Zoologist, 36*(4), 402-434. https://doi.org/10.1093/icb/36.4.402

Kajiyama, H., Mattos, L. U., Silva, I. F. D., Annunciato, N. F., & Marques, M. R. (1982). Influência do estado nutricional sobre a duração do ciclo estral de ratas. *Revista da Escola de Enfermagem da USP, 16*(1), 27-35. https://doi.org/10.1590/0080-6234198201600100027

Kamil, A. C., & Roitblat, H. L. (1985). The ecology of foraging behavior: Implications for animal learning and memory. *Annual Review of Psychology, 36*(1), 141-169. https://doi.org/10.1146/annurev.psych.36.1.141

Koot, S., van den Bos, R., Adriani, W., & Laviola, G. (2009). Gender differences in delay-discounting under mild food restriction. *Behavioural Brain Research, 200*(1), 134-143. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.006

Lagorio, C. H., & Madden, G. J. (2005). Delay discounting of real and hypothetical rewards III: steady-state assessments, forced-choice trials, and all real rewards. *Behavioural Processes, 69*(2), 173-187. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.02.003

Leshner, A. I., Siegel, H. I., & Collier, G. (1972). Dietary self-selection by pregnant and lactating rats. *Physiology & Behavior, 8*(1), 151-154. https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90144-8

Liang, H., & Zhang, Z. (2006). Food restriction affects reproduction and survival of F1 and F2 offspring of rat-like hamster (Cricetulus triton). *Physiology & Behavior, 87*(3), 607-613. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.12.006

Logue, A. W., Chavarro, A., Rachlin, H., & Reeder, R. W. (1988). Impulsiveness in pigeons living in the experimental chamber. *Animal Learning & Behavior, 16*(1), 31-39. https://doi.org/10.3758/BF03209040

Logue, A. W., & Peña-Correal, T. E. (1985). The effect of food deprivation on self-control. *Behavioural Processes, 10*(4), 355-368. https://doi.org/10.1016/0376-6357(85)90036-1

Long, J. A., & Evans, H. M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena (Vol. 6). University of California Press.

Lovick, T. A. (2014). Sex determinants of experimental panic attacks. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 46*, 465-471. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.006

Lukkes, J. L., Thompson, B. S., Freund, N., & Andersen, S. L. (2016). The developmental inter-relationships between activity, novelty preferences, and delay discounting in male and female rats. *Developmental Psychobiology, 58*(2), 231-242. https://doi.org/10.1002/dev.21368

MacArthur, R. H., & Pianka, E. R. (1966). On optimal use of a patchy environment. *American Naturalist, 100*(916), 603-609. https://doi.org/10.1086/282454

Magni, S., Krekule, I., & Bureš, J. (1979). Radial maze type as a determinant of the choice behavior of rats. *Journal of Neuroscience Methods, 1*(4), 343-352. https://doi.org/10.1016/0165-0270(79)90023-2

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology, 62*(4A), 609-614. https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008

Mazeti, C. M., & Furlan, M. M. D. P. (2008). Crescimento e parâmetros reprodutivos de ratas Wistar, em restrição alimentar desde o nascimento. *Acta Scientiarum. Biological Sciences, 30*(2), 197-204. https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v30i2.3623

Mazur, J. E. (1987*).* An adjusting procedure for studying delayed reinforcement. In.: Commons, M. L., Mazur, J. E. & Nevin, J. A., *The effect of delay and intervening events on reinforcement value* (55-73). NJ: Erlbaum.

Mazur, J. E (1988a). Choice between small certain and large uncertain reinforcers. *Animal Learning & Behavior, 16*(2), 199-205. https://doi.org/10.3758/BF03209066

Mazur, J. E. (1988b). Estimation of indifference points with an adjusting-delay procedure. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 49*(1), 37-47. https://doi.org/10.1901/jeab.1988.49-37

Mazur, J. E. (2004). Risky choice: Selecting between certain and uncertain outcomes. *The Behavior Analyst Today*, 5(2), 190-202. http://dx.doi.org/10.1037/h0100031

Mazur, J. E. (2017). Learning and Behavior. New York, NY: Routledge.

Mazur, J. E., & Biondi, D. R. (2011). Effects of time between trials on rats' and pigeons' choices with probabilistic delayed reinforcers. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 95*(1), 41-56. https://doi.org/10.1901/jeab.2011.95-41

Merry, B. J., & Holehan, A. M. (1979). Onset of puberty and duration of fertility in rats fed a restricted diet. *Reproduction, 57*(2), 253-259. https://doi.org/ 10.1530/jrf.0.0570253

Milad, M. R., Igoe, S. A., Lebron-Milad, K., & Novales, J. E. (2009). Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience, 164*(3), 887-895. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.011

Morgane, P. J., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 26*(4), 471-483. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00012-X

Nunes, M. L., Batista, B. B., Micheli, F., & Batistella, V. (2002). Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *Jornal de Pediatria, 78*(1), 39-44. https://doi.org/10.1590/S0021-75572002000100009

Okaichi, H., & Oshima, Y. (1990). Choice behavior of hippocampectomized rats in the radial arm maze. *Psychobiology, 18*(4), 416-421.

Oliveira, L., Calvert, A. L., Green, L., & Myerson, J. (2013). Level of deprivation does not affect degree of discounting in pigeons. *Learning & Behavior, 41*(2), 148-158. https://doi.org/10.3758/s13420-012-0092-4.

Ohmura, Y., Takahashi, T., & Kitamura, N. (2005). Discounting delayed and probabilistic monetary gains and losses by smokers of cigarettes. *Psychopharmacology, 182*(4), 508-515. https://doi.org/ 10.1007/s00213-005-0110-8

Orsini, C. A., & Setlow, B. (2017). Sex differences in animal models of decision making. *Journal of Neuroscience Research, 95*(1-2), 260-269. https://doi.org/10.1002/jnr.23810

Orsini, C. A., Trotta, R. T., Bizon, J. L., & Setlow, B. (2015). Dissociable roles for the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in decision-making under risk of punishment. *Journal of Neuroscience, 35*(4), 1368-1379. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3586-14.2015

Orsini, C. A., Willis, M. L., Gilbert, R. J., Bizon, J. L. & Setlow, B. (2016) Sex differences in a rat model of risk decision making. *Behavioral Neuroscience, 130*(1), 50-61. https://doi.org/10.1037/bne0000111

Ostaszewski, P., Karzel, K., & Białaszek, W. (2004). Temporal discounting in RHA/Verh and RLA/Verh rats: Adaptation to food deprivation. *Polish Psychological Bulletin, 35*, 97-97.

Ostaszewski, P., Karzel, K., & Szafrańska, P. (2003). Changes in discounting rates as adaptation to food deprivation in rats: The role of age and deprivation level. *Polish Psychological Bulletin, 34*, 203-211.

Ôta, K., & Yokoyama, A. (1967). Body weight and food consumption of lactating rats: Effects of ovariectomy and of arrest and resumption of suckling. *Journal of Endocrinology, 38*(3), 251-261. https://doi.org/10.1677/joe.0.0380251

Peak, J. N., Turner, K. M., & Burne, T. H. J. (2015). The effect of developmental vitamin D deficiency in male and female Sprague–Dawley rats on decision-making using a rodent gambling task. *Physiology & Behavior, 138*, 319-324. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.007

Pellman, B. A., Schuessler, B. P., Tellakat, M., & Kim, J. J. (2017). Sexually Dimorphic Risk Mitigation Strategies in Rats. *eNeuro, 4*(1). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0288-16.2017

Perry, J. L., Larson, E. B., German, J. P., Madden, G. J., & Carroll, M. E. (2005). Impulsivity (delay discounting) as a predictor of acquisition of IV cocaine self-administration in female rats. *Psychopharmacology, 178*(2-3), 193-201. https://doi.org/ 10.1007/s00213-004-1994-4

Perry, J. L., Nelson, S. E., & Carroll, M. E. (2008). Impulsive choice as a predictor of acquisition of IV cocaine self-administration and reinstatement of cocaine-seeking behavior in male and female rats. *Experimental and Clinical Psychopharmacology, 16*(2), 165–177. https://doi.org/10.1037/1064-1297.16.2.165

Pliskoff, S. S., & Fetterman, J. G. (1981). Undermatching and overmatching: The fixed-ratio changeover requirement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 36*(1), 21-27. https://doi.org/10.1901/jeab.1981.36-21

Prendergast, B. J., Onishi, K. G., & Zucker, I. (2014). Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 40,* 1-5. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001

Prince, A., Murphy, E. S., & Lupfer, G. (2020). Effects of food restriction and pre-training length on delay discounting in male Wistar rats. *The Psychological Record*, *70*(1), 91-98. https://doi.org/10.1007/s40732-019-00371-4

Rachlin, H. (1974). Self-control. *Behaviorism, 2,* 94-107.

Rachlin, H. & Green, L. (1972). Commitment, choice and self-control. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 17,* 15-22. https://doi.org/10.1901/jeab.1972.17-15

Rachlin, H., Logue, A. W., Gibbon, J., & Frankel, M. (1986). Cognition and behavior in studies of choice. *Psychological Review, 93*(1), 33–45. https://doi.org/10.1037/0033-295X.93.1.33

Rajab, E., Alqanbar, B., Naiser, M. J., Abdulla, H. A., Al-Momen, M. M., & Kamal, A. (2014). Sex differences in learning and memory following short-term dietary restriction in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience, 36,* 74-80. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.05.011

Reyes-Castro, L. A., Rodriguez, J. S., Rodriguez-Gonzalez, G. L., Wimmer, R. D., McDonald, T. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W., & Zambrano, E. (2011). Pre-and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience, 29,* 177-182. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2010.11.002

Richards, J. B., Mitchell, S. H., De Wit, H., & Seiden, L. S. (1997). Determination of discount functions in rats with an adjusting-amount procedure. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 67*(3), 353-366. https://doi.org/10.1901/jeab.1997.67-353

Richter, C. P., & Barelare, B. (1938). Nutritional requirements of pregnant and lactating rats studied by the selfselection method. *Endocrinology, 23*(1), 15-24. https://doi.org/10.1210/endo-23-1-15

Rocinholi, L. F., Almeida, S. S., & De-Oliveira, L. M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30*, 407-413. https://doi.org/10.1590/S0100879X1997000300016

Santos-Pinto, J. Luz, MA Griggio, F. N. (2001). Energy expenditure of rats subjected to long-term food restriction. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 52*(2), 193-200. https://doi.org/10.1080/09637480020027000-1

Santos, B. F. (2002). Criação e manejo de ratos. In: Andrade, A., Pinto, S. C., De Oliveira, R S. *Animais de Laboratório: Criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Fiocruz, 118-121.

Schweigert, I. D., Souza, D. O. G, & Perry, M. L. S. (2009). Desnutrição, maturação do sistema nervoso central e doenças neuropsiquiátricas. *Revista de Nutrição, 22* (2), 271-281. https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000200009

Shansky, R. M. (2018). Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls. *Current Opinion in Neurobiology, 49*, 95-98. https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.007

Shibatta, O. A., & Rocha, A. J. A. (2001). Feeding in males and females of pirá brasília, Simpsonichthys boitonei Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Revista Brasileira de Zoologia, 18*(2), 381-385. https://doi.org/10.1590/S0101-81752001000200007

Skinner, B F. (1950). Are theories of learning necessary? *Psychological Review, 57*, 193-216. https://doi.org/10.1037/h0054367

Slonaker, J. B. (1925). The effect of copulation, pregnancy, pseudopregnancy and lactation on the voluntary activity and food consumption of the albino rat. *American Journal of Physiology, 71*(2), 229-264. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1925.71.2.362

Smallegange, I. M., & van der Meer, J. (2003). Why do shore crabs not prefer the most profitable mussels? *Journal of Animal Ecology, 72*(4), 599-607. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00729.x

Snyderman, M. (1983). Optimal prey selection: The effects of food deprivation. *Behaviour Analysis Letters, 3*, 359-370.

Szelest, I., & Cohen, J. (2006). Effects of forced-choice runway variations on rats' T-maze serial pattern learning. *Learning & Behavior, 34*(2), 202-214. https://doi.org/10.3758/bf03193195

Timberlake, W., Gawley, D. J., & Lucas, G. A. (1987). Time horizons in rats foraging for food in temporally separated patches. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 13*, 302-309. https://doi.org/10.1037/0097-7403.13.3.302

Todorov, J. C. & Hanna, E. S. (2007). Quantificação de escolhas e preferências. In J. Abreu-Rodrigues & M. R. Ribeiro (Org.) *Análise do Comportamento: Pesquisa, Teoria e Aplicação* (159-174). Porto Alegre: Artmed.

Tonkiss, J., Galler, J. R., Formica, R. N., Shukitt-Hale, B., & Timm, R. R. (1990). Fetal protein malnutrition impairs acquisition of a DRL task in adult rats. *Physiology & Behavior, 48*(1), 73-77. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90263-4

Uban, K. A., Rummel, J., Floresco, S. B., & Galea, L. A. (2012). Estradiol modulates effort-based decision making in female rats. *Neuropsychopharmacology, 37*(2), 390. https://doi.org/10.1038/npp.2011.176

Valadares, C. T., Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., Hernandes, A. S., & Almeida, S. S. (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience, 13*, 274-282. https://doi.org/10.1179/147683010x12611460764769

Velasco, S. M., Garcia-Mijares, M., & Tomanari, G. Y. (2010). Fundamentos metodológicos da pesquisa em análise experimental do comportamento. *Revista Psicologia em Pesquisa, 4*(2), 150-155.

van den Bos, R., Jolles, J., van der Knaap, L., Baars, A., & de Visser, L. (2012). Male and female Wistar rats differ in decision-making performance in a rodent version of the Iowa Gambling Task. *Behavioural Brain Research, 234*(2), 375-379. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.015

Vieira, M. L. (2003) Comportamento materno e paterno em roedores. *Biotemas, 16*(2), 159-180. https://doi.org/10.5007/%25x

Wallin-Miller, K. G., Chesley, J., Castrillon, J., & Wood, R. I. (2017). Sex differences and hormonal modulation of ethanol-enhanced risk taking in rats. *Drug & Alcohol Dependence, 174*, 137-144. https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.01.023

Wilhelm, C. J., & Mitchell, S. H. (2008). Rats bred for high alcohol drinking are more sensitive to delayed and probabilistic outcomes. Genes, *Brain and Behavior, 7*(7), 705-713. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00406.x

Woodside, B., & Millelire, L. (1987). Self-selection of calcium during pregnancy and lactation in rats. *Physiology & Behavior, 39*(3), 291-295. https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90224-1

Yang, Y., Qin, J., Chen, W., Sui, N., Chen, H., & Li, M. (2015). Behavioral and pharmacological investigation of anxiety and maternal responsiveness of postpartum female rats in a pup elevated plus maze. *Behavioural Brain Research, 292*, 414-427. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.07.010

Yoest, K. E., Cummings, J. A., Becker, J. B. (2014). Estradiol, dopamine, and motivation. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 14*(7), 83 - 89. https://doi.org/10.2174/1871524914666141226103135

Zoratto, F., Laviola, G., & Adriani, W. (2016). The subjective value of probabilistic outcomes: Impact of reward magnitude on choice with uncertain rewards in rats. *Neuroscience Letters*, *617*, 225-231. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.026

Zucoloto, F. S. (2013). A evolução do comportamento alimentar na espécie humana. In S. S. Almeida; T. M. B. Costa; M. F. Laus & Straatmann, G. (Org.) *Psicobiologia do Comportamento Alimentar* (11-31). Rio de Janeiro: Rubio.

ANEXOS

Anexo A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FFCLRP.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Comportamento de escolha em fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo, em comparação com machos**", registrada sob nº 16.5.677.59.5, sob a responsabilidade de, **Sara Tamiris Cirilo Fernandes** que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

A proposta foi aprovada na reunião de 27/04/2017 e o relatório final aprovado *ad referendum* em 06/10/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/05/2017 a 31/03/2020
Espécie/Linhagem	Wistar
Nº de animais	12
Peso/Idade	45-60g/21 dias
Sexo	6 machos e 6 fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - CEMIB

Ribeirão Preto, 10 de novembro de 2020.

Profa. Dra. Patrícia Ferreira Monticelli
Coordenadora da CEUA-FFCLRP/USP

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da FFCLRP USP
Fone: (16) 3315-4811 Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 01 da Administração - sala 06
CEP: 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: ceua@listas.ffclrp.usp.br

Anexo B - Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFRP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comportamento de escolha de fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*) em diferentes fases do ciclo reprodutivo, em comparação com machos", registrada sob nº 17.1.882.60.5, sob a responsabilidade de Sara Tamiris Cirilo Fernandes e Andréia Schmidt, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

A proposta foi aprovada na reunião de 26/10/2017 e o relatório final foi aprovado *ad referendum* em 15/10/2020 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	24/11/2017 a 31/03/2020	
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar	
Nº de animais	6	12
Peso/Idade	45-60g/ 21 dias	45-60g/ 21 dias
Sexo	Macho	Fêmea
Origem	Centro Multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência em animais de laboratório - UNICAMP	

Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2020.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comissão de Ética no Uso de Animais – ceua@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-8559 – Fax: (16) 33152-4892

Anexo C - Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da FORP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que a proposta intitulada **"Comportamento de escolha de fêmeas Wistar (Rattus norvegicus) em difertentes fases do ciclo reprodutivo, em comparação com machos"**, registrada com o nº 2017.1.489.58.0 sob a responsabilidade da Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi – 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 08 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 20/09/2017.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/10/2017 a 30/09/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6 / 12
Peso/Idade	180-300 g / 70 dias
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 2 de setembro de 2017.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA- FORP/USP