



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAIMON PIRES MAIO

**EFEITOS DA ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS
SOBRE O COMPORTAMENTO EM SESSÕES
PROLONGADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Londrina
2014

TAIMON PIRES MAIO

**EFEITOS DA ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS
SOBRE O COMPORTAMENTO EM SESSÕES
PROLONGADAS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Análise do Comportamento –
Universidade Estadual de Londrina, como
cumprimento dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Análise do Comportamento.
Orientador: Dr. Célio R. Estanislau.

Londrina
2014

TAIMON PIRES MAIO

**EFEITOS DA ILUMINAÇÃO NOS BRAÇOS FECHADOS SOBRE O
COMPORTAMENTO EM SESSÕES PROLONGADAS NO LABIRINTO
EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análise do Comportamento – Universidade Estadual de Londrina, como cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior
Universidade Federal do Pará - UFPA

Prof. Dr. Célio R. Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dra Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de setembro de 2014.

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M227e Maio, Taimon Pires.

Efeitos da iluminação nos braços fechados sobre o comportamento em sessões prolongadas no labirinto em cruz elevado / Taimon Pires Maio. – Londrina, 2014. vi, 24f. : il.

Orientador: Célio Roberto Estanislau.

Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Comportamento – Análise – Teses. 2. Ansiedade – Teses. 3. Conflito (Psicologia) – Teses. 4. Transtorno obsessivo-compulsivo – Teses. 5. Modelos animais – Teses. I. Estanislau, Célio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

CDU 159.9.019.43

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

- Figura 1** - Representação esquemática da taxa de luminosidade para LCE convencional (Grupo CTL) e para o LCE modificado (Grupo ILU) 11
- Figura 2** - Medidas de tempo nos braços abertos (A), frequência de entradas nos fechados (B), tempo nos fechados (C) e tempo no centro (D) 17
- Figura 3** - Medidas de *grooming* rostral e corporal..... 18

Tabelas

- Tabela 1** - Médias e erro de outras medidas no LCE..... 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
IRS	Inibidor da recaptação de serotonina tricíclicos
LCE	Labirinto em cruz elevado
CTL	Grupo controle
ILU	Grupo experimental (submetido ao labirinto com alta iluminação nos braços fechados)
SAP	Avaliação de risco (<i>stretched attend postures</i>)

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
Resumo	1
Abstract	1
Apresentação	1
1 Introdução	2
2 Materiais e métodos	9
2.1 Sujeitos.....	9
2.2 Equipamentos.....	9
2.3 Delineamento e procedimento	11
2.4 Medidas comportamentais	12
2.4.1 <i>Grooming</i>	12
2.5 Análises dos dados.....	13
3 Resultados	15
4 Discussão	19
Referências	22

Maio, Taimon Pires. **Efeitos da iluminação nos braços fechados sobre o comportamento em sessões prolongadas no labirinto em cruz elevado**. 2014. 24p. Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Análise do comportamento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), Brasil.

RESUMO

O tempo e porcentagem de entradas de ratos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE) são considerados as principais medidas de ansiedade do procedimento. Uma vez que a literatura demonstra efeitos ansiolíticos discrepantes de antidepressivos de segunda geração no teste, estudos suplementares com alterações procedimentais tornam-se relevantes na medida em que possibilitem evidenciar efeitos ansiolíticos consistentes da droga. Adicionalmente às medidas comportamentais convencionais dos modelos animais de ansiedade, uma medida que tem se mostrado relevante no desenvolvimento desses modelos é a autolimpeza de roedores (*grooming*). O *grooming* é um comportamento estereotipado considerado um possível análogo do Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) de seres humanos. Embora o *grooming* seja proposto como uma possível medida de ansiedade sensível a determinadas situações ambientais, tanto ele como as medidas convencionais do LCE, foram somente estudadas em situações de conflito de curta duração. Há, portanto, a necessidade de se ampliar a validade de processo do labirinto em cruz elevado como modelo de ansiedade de forma geral e do *grooming* como um potencial comportamento análogo ao TOC de forma específica, bem como a necessidade de forjar situações contextualmente válidas para a ocorrência do *grooming*. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo desenvolver e testar a capacidade de um procedimento modificado de conflito no LCE em estender o período de aversividade experimental, de modo a possibilitar a avaliação de comportamentos de conflito em ratos. Para a configuração de uma situação de conflito prolongado, foram acesas duas lâmpadas de LED 30 cm acima de cada braço fechado do labirinto. Dezenove ratos foram distribuídos entre os grupos controle (CTL) e experimental (ILU). A sessão de teste durou 20 minutos. Os resultados indicam, de fato, que o grupo ILU passou menos tempo que o CTL nos braços fechados. O grupo ILU, entretanto, demonstrou maior índice de tempo total da sessão no centro do labirinto do que o CTL, havendo maior diferença no segundo e terceiro bloco de sessão. Não foram encontrados efeitos no tempo gasto nos braços abertos. Sugere-se que o tempo no centro possa indicar um potencial conflito ao longo da sessão e que a manipulação experimental foi efetiva em estendê-lo. Se o tempo no centro é um índice de conflito no LCE, este estudo sugere que a manipulação experimental foi efetiva em prolongar o conflito. O fato de haver redução mas não supressão do *grooming* corporal no grupo experimental sugere que a iluminação induz aversividade moderada nos ratos, tornando assim o *grooming* como um índice potencial para a avaliação do efeito de drogas em futuros estudos. Entende-se que a iluminação elevou o tempo no centro no grupo experimental, sem afetar o tempo nos braços abertos. Sugere-se que o tempo no centro pode indicar uma potencial manutenção do conflito ao longo da sessão e que a manipulação experimental foi eficiente em prolongá-lo. A observação de que há redução, mas não supressão de *grooming* corporal dos ratos do grupo experimental, sugere que a iluminação induz aversividade moderada e prolongada nos ratos, permitindo manter o *grooming* como um índice para a avaliação do efeito de fármacos em futuros estudos.

Palavras-chave: Paradigma de conflito. Conflito afastamento-afastamento. Labirinto em cruz elevado. *Grooming*. Ansiedade.

Maio, Taimon Pires. **Effects of illumination in the closed arms on behavior in prolonged sessions in the elevated plus maze.** 2014. 24p. Thesis, Behavior Analysis Post Graduation Program, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), Brasil.

ABSTRACT

The percentage and time of entries of rats in the open arms of the elevated plus-maze (EPM) are considered the main anxiety measures in this test. Since the literature shows discrepant anxiolytic effects of second generation antidepressant drugs in the test, additional studies with procedural changes become relevant because they can make possible to demonstrate consistent anxiolytic effects of the drug. In addition to conventional behavioral measures of the animal models of anxiety, one measure that has been proposed as relevant in the development of these models is the rodent grooming. Grooming is a stereotyped behavior that is also considered possible an analogous to OCD in humans. Although grooming is proposed as a possible measure of anxiety which is sensitive to certain environmental situation, both grooming and conventional measures of the EPM, were studied only in situations of short duration conflict. There is a need for extending the construct validity of the elevated plus maze as an anxiety model in a general sense, and of grooming as a potential OCD analogue behavior in a specific way, as well the need to forge situations contextually valid for the occurrence of grooming. In this sense, the present study aimed to developing and testing the ability of a modified conflict procedure in the EPM to extend the trial period of experimental aversiveness, in order to permit evaluation of conflict behaviors in rats. For setting up a situation of lasting conflict, two LED lamps were lit 30 cm above each closed arm of the maze. Nineteen rats were divided into control (CTL) and experimental groups (ILU). The test session lasted 20 minutes. Results indicate that the ILU group spent less time in the closed arms than the CTL group. The ILU, indeed, showed a higher rate of total time of the session in the center of the maze than the CTL group, with greater difference in the second and third blocks of the session. No effects were found in the time spent in the open arms. It is suggested that time in the center can indicates a potential conflict over the session and that experimental manipulation was effective in prolonging conflict. The fact that there was reduction but not suppression of body grooming in the experimental group suggests that illumination induces moderate aversiveness in the rats, thus rendering grooming as a potential index for evaluating the effect of drugs in future studies.

Keywords: Paradigm of conflict. Avoidance-avoidance conflict. Elevated plus maze. Grooming. Anxiety.

Apresentação

A dissertação consiste em um experimento-piloto acerca dos efeitos de um procedimento modificado de conflito no labirinto em cruz elevado no comportamento de ratos. No intuito de melhor compreender-se a proposta deste estudo, serão discutidos alguns pontos considerados chave. Inicialmente será dado um panorama geral sobre potenciais relações entre o labirinto em cruz elevado, as situações de conflito, o *grooming* de roedores e o transtorno obsessivo-compulsivo de seres humanos. Posteriormente descreve-se o processo de desenvolvimento do procedimento de conflito estendido utilizando o labirinto em cruz elevado, bem como os seus efeitos no comportamento de ratos submetidos à sessão prolongada de teste. Finaliza-se discutindo os resultados do procedimento e sua potencial utilidade para futuros estudos.

No processo de desenvolvimento da dissertação, foram realizadas revisões preliminares de literatura acerca dos principais modelos animais de ansiedade e do Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC). A partir das revisões, percebeu-se a lacuna na literatura a respeito de uma revisão que relacionasse as diferenças de linhagens de ratos com o TOC. Efetuou-se tal revisão, culminando assim na formulação de um artigo que foi publicado no periódico *World Journal of Neuroscience* (Anexo 1).

1 Introdução

O Labirinto em cruz elevado (LCE) consiste em um modelo animal de ansiedade vastamente utilizado. O modelo foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado comportamentalmente por Pellow e colaboradores (1985). O procedimento baseia-se na simultânea tendência apresentada por roedores em explorar ambientes novos e ao mesmo tempo evitar os espaços abertos. O LCE é feito de madeira e é elevado do piso da sala, sendo composto por dois corredores (braços) com paredes laterais fechadas e dois braços sem paredes (abertos). Os braços abertos possuem bordas de acrílico a fim de se evitar quedas dos animais (Graeff, 2005).

Cabe ressaltar que, embora considere-se que o LCE possua boa validade preditiva para agentes farmacológicos ansiolíticos benzodiazepínicos, a literatura não tem apontado dados consistentes do modelo em relação à detecção de agentes não-benzodiazepínicos, como os fármacos serotoninérgicos (Graeff, 2005), comumente prescritos em quadros de ansiedade humana (Stahl, 2000) – o que prejudica parcialmente a validade preditiva do modelo.

O LCE configura uma situação de conflito na indução da ansiedade, uma vez que o animal é confrontado com eventos que geram tendências de respostas que são incompatíveis entre si (Aupperle & Paulus, 2010), constituindo, assim, uma condição de dificuldade de tomada de decisão. Frequentemente úteis por possibilitarem a detecção de novos agentes farmacológicos ansiolíticos (e.g., Millan & Brocco, 2003), os modelos animais etológicos, como o LCE, têm se destacado por fazerem uso de comportamentos naturais de uma espécie, o que acarreta em maior economia de tempo e simplicidade metodológica, visto que tais modelos usualmente não requerem um processo prévio de treinamento do animal. Dentre tais modelos, pode-se citar ainda o teste de transição claro-escuro, que incorpora a intensa iluminação na indução do conflito (Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1981).

Um dos problemas dos modelos etológicos que se utilizam do conflito é que (1) o conflito por eles gerado não perdura por um período prolongado de teste. No LCE o rato geralmente demonstra preferência pelos braços fechados do aparato após alguns minutos de exploração (Carobrez & Bertoglio, 2005). Reconhece-se ainda que (2) a exposição inicial do rato ao labirinto ocasiona a redução da sensibilidade aos agentes ansiolíticos benzodiazepínicos em uma segunda exposição, fenômeno denominado tolerância de primeira passagem – *one-trial tolerance* – e que tem sido extensamente estudado (e.g., Stern, Carobrez & Bertoglio, 2008; File, Schneider, Mabbutt, P. S., & Hitchcott, P. K., 1990; P., Ho, Y. J., Spanagel, R., & Pawlak, C. R., 2011).

Eventualmente são realizadas alterações procedimentais nos modelos etológicos na tentativa de ampliar a duração do conflito gerado. Pode-se citar o estudo de Pereira e colaboradores (1999) em que, ao exporem ratos pela segunda vez ao labirinto em cruz elevado em sessões de cinco minutos, utilizaram uma luz intensa incidindo sobre o braço fechado do labirinto somado a liberação de um jato de ar toda vez que o animal entrava no braço; deste modo aumentou-se a aversividade da situação experimental e reduziu-se a tolerância de primeira passagem frente à administração de um ansiolítico benzodiazepínico. Essa contingência configura uma situação de conflito mais duradoura denominada afastamento-afastamento.

Diferentemente dos modelos etológicos citados, alguns modelos animais não-etológicos envolvem o uso de procedimentos experimentais geradores de conflito duradouros, como o teste de conflito de Vogel e o teste de conflito de Geller-Seifter (Graeff, 2005). Ambos os testes envolvem, porém, a privação hídrica ou alimentar do rato, o que possibilita um processo de treino. As limitações de tais testes em relação aos modelos etológicos, são que a privação e o treino prévio do animal dificultam a interpretação dos resultados obtidos. Além disso, apesar da capacidade de detecção de ansiolíticos benzodiazepínicos, tais testes não se

mostram sensíveis à detecção de ansiolíticos não-benzodiazepínicos e a drogas ansiogênicas, sendo questionável sua validade enquanto modelos animais de ansiedade (Graeff, 2005).

Junto a outros procedimentos geradores de ansiedade, o LCE tem sido utilizado para o estudo de outros comportamentos previamente associados ao estresse/ansiedade, como o *grooming* de roedores (Spruijt, van Hoof & Gispen, 1992). O *grooming* consiste em respostas direcionadas à pele altamente especializadas e que geram estimulação tátil, como o lavar-se, coçar-se, lambe-se e morder-se (Lepekhina & Tsitsurina, 2009). Tal comportamento está presente em diversas espécies e tem sido associado a múltiplas funções, como termoregulação (Haisnworth, 1967), prevenir o animal contra parasitas e manter o pelo em bom estado (Spruijt, van Hoof, & Gispen, 1992).

O *grooming* observado em algumas espécies de roedores foi também associado ao TOC de seres humanos, uma vez que ele é por vezes executado de forma estereotipada (Berridge, Fentress & Parr, 1987; Berridge, 1990). Demonstrou-se, por exemplo, que cadeias de *grooming* tendem a apresentar uma combinação de quatro fases (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005) compostas por sequências de movimentos rítmicos e anatomicamente distribuídos (Berridge, K. C, 1990; Berridge; Fentress & Parr, 1987) – a chamada *cadeia sintática* (para uma descrição detalhada, ver Sessão 2.4.1). Estudos recentes envolvendo análises comportamentais em sessões prolongadas de testes de estresse/ansiedade em ratos (Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A., 2013). Veloso, 2012), tem demonstrado que a duração do *grooming* na região corporal aumenta após os minutos iniciais de teste, o que sugere que este componente possa ser uma medida de *dearousal* (habituação) frente a eventos estressores. Tal observação aponta para a necessidade de mais estudos comportamentais sobre *grooming*, dada sua potencial utilidade para os modelos animais de ansiedade.

Neurobiologicamente o *grooming* de roedores pode ser induzido mediante administração central de hormônio adenocorticotrópico (Spruijt, van Hoof & Gispen, 1992), reforçando o papel do estresse nessa resposta. Já no que se refere a neurobiologia do TOC, o *grooming* também está associado a alterações no estriado, como pode ser atestado em modelos animais de TOC que envolvem manipulação genética e adotam o *grooming* de camundongos como medida de compulsividade (Greer & Capecchi, 2002; Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005).

Relativo à testagem farmacológica, no teste do campo aberto foi relatado aumento na duração do *grooming* mediante o tratamento crônico com o ISRS fluoxetina – droga reconhecida por seus efeitos ansiolíticos em seres humanos (Schulz, Buddenberg, & Huston, 2007), muito embora também tenha sido observado efeitos inconsistentes com administração aguda de antidepressivos, como amitriptilina e fluoxetina (Enginar, N., Hatipoğlu, I., & Firtina, 2008). O aumento de *grooming* também foi relatado em resposta ao benzodiazepínico clordiazepóxido em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado (Rodgers, Davies, & Shore, 2002). Ressalta-se, porém, que tais estudos não objetivavam realizar uma análise detalhada dos dois componentes do *grooming* já relatados, não sendo possível saber qual componente comportamental (rostral ou corporal) foi mais afetado pelos diferentes tratamentos.

O transtorno obsessivo-compulsivo tem sido associado com significativo grau de sofrimento e incapacidade, apresentando uma prevalência de 1,2% ao longo da vida (Kessler, 2005). É comum que indivíduos diagnosticados com o TOC relatem que suas obsessões e compulsões tendem a aumentar em situações relacionadas à tomada de decisão e incerteza (Ristvedt, Mackenzies & Christenson, 1993). Alguns estudos também apontam que tais indivíduos apresentam um aumentado tempo de reação em tarefas cognitivas (Penades, 2007; Melcher, Falkai & Gruber, 2008). No que se refere aos aspectos clínicos presentes em pessoas

diagnosticadas com TOC, sabe-se que comportamentos de fuga e esquivas são frequentemente relacionados a preocupações obsessivas e compulsões, de tal forma que as estereotípias e repetições em humanos (Aouizerate, et al., 2004; First, Frances, & Pincus, 2004), em analogia ao *grooming* de roedores, foram sugeridas como sendo respostas de enfrentamento para a redução da ansiedade (Spruijt, van Hoof & Gispen, 1992).

Em relação ao papel do conflito no TOC, sabe-se ainda que disfunções no sistema serotoninérgico estão associadas a déficits no repertório comportamental de tomada de decisão e que indivíduos com o transtorno apresentam esse déficit comportamental (Homberg, 2012). De fato, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, e os inibidores de recaptação de serotonina tricíclicos (IRS), como a clomipramina, tem sido eleitos como os tratamentos farmacológicos de primeira escolha no quadro (Korff & Harvey, 2006). De forma análoga ao que ocorre em humanos, no âmbito dos modelos animais a dificuldade de tomada de decisão também pode ser observada quando há tendências opostas de ação usualmente induzidas em situações de conflito (Graeff, 2005).

Foi afirmado também que o comportamento de *grooming* de ratos pode ser observado em situações em que dois sistemas comportamentais são ativados simultaneamente (i.e., em situações de conflito) (Spruijt, van Hoof, & Gispen, 1992). Diversos estudos, porém, não tem gerado situações de conflito contextualmente válidas para se avaliar esse comportamento. Em um estudo, por exemplo, fez-se o uso de estímulos que induzem o *grooming* por razões não necessariamente relacionadas à aversividade, como o *grooming* induzido por um esguicho de água no rato (e.g., Greer & Capecchi, 2002), enquanto há trabalhos em que não foram adotados procedimentos cuja aversividade situacional se mantenha por um período prolongado de testagem (e.g., van Erp et al., 1994; Kalueff & Tuohimaa, 2005), tal como também ocorre no procedimento do LCE em sessões de 5 minutos.

Além das dificuldades já mencionadas referentes à validação contextual de procedimentos de conflito no que tange a indução do *grooming*, soma-se ainda o fato de que algumas variáveis, como a privação hídrica e alimentar, estão associadas à redução desse comportamento (Ritter & Epstein, 1974). Portanto, no intuito de se avaliar a validade de processo comportamental/contextual envolvida na indução de *grooming* que possibilite posteriores testes referentes à validade preditiva farmacológica dessa resposta à administração de um ISRS, faz-se necessário elaborar um procedimento que evite o uso de restrição hídrica e alimentar e que apresente similaridade contextual que se presume estar relacionado ao aumento de sintomas do TOC em humanos, isto é, uma situação de conflito duradoura.

No intuito de transpor as limitações acima mencionadas, o presente estudo teve por objetivo desenvolver e testar a capacidade de um procedimento modificado de conflito no LCE em estender o período de aversividade experimental, de modo a possibilitar a avaliação de comportamentos de conflito em ratos (e.g., preferência espacial pelo centro do LCE), bem como seu efeito nas respostas de *grooming*. Adicionalmente, foram analisadas como as medidas convencionais do LCE respondem ao novo procedimento.

Para cumprir com os objetivos propostos, o LCE do presente estudo sofreu uma modificação no intuito de produzir uma situação de conflito mais duradoura entre o comportamento de escolha dos ratos pelos braços abertos ou fechados. Uma vez que ratos tendem a se afastar de ambientes iluminados (Bouwknicht, Spiga, Staub, Hale, Shekhar, & Lowry, 2007) foram acesas luzes no interior dos braços fechados do labirinto, ao passo que os braços abertos mantiveram baixa luminosidade. Para que o parâmetro de aversividade da luminosidade fosse o mais contrastante possível entre os braços abertos e os braços fechados do LCE, a alteração procedimental utilizada baseou-se nos parâmetros de luminosidade de uma versão do teste claro-escuro proposta por Takao e Miyakawa (2006). Na versão do teste

dos autores, no compartimento escuro da câmara a intensidade de luminosidade é de 2 lux (lx) e no compartimento claro a luminosidade é de 390 lx.

2 Materiais e métodos

2.1 Sujeitos

Dezenove (19) ratos Wistar (*Rattus Norvegicus*) adultos machos com peso entre 250 e 300 gramas foram obtidos de uma colônia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram alojados no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC), sob um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes às 7: 00 h) e temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$. Cada gaiola de prolipileno (40 cm x 34 cm x 17 cm) foi forrada com cepilho e abrigou um grupo de quatro ratos, aos quais alimento e água ficaram disponíveis *ad libitum*.

O projeto foi aprovado por parte da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL, 53/2014) e realizado segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento e que foram, por sua vez, fundamentadas nas recomendações do *US National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

2.2 Equipamentos

Caixas de prolipileno (28 cm x 17 cm x 13 cm) foram utilizadas para a familiarização a antessala de teste (ver na Sessão 4.3). Para o teste foi utilizado no presente estudo LCE feito de madeira e pintado de branco. Constituiu-se por dois braços fechados (50 cm x 12 cm) cercada por paredes de madeira (40 cm de altura) e perpendiculares a dois braços abertos (50 cm x 12 cm). Um quadrado central (12 cm x 12 cm) une os quatro braços. Para evitar quedas do rato, os braços abertos foram cercados com uma borda de plaxiglas de 1 cm de altura (Figura 1).

Para todos os ratos testados, foi utilizada uma lâmpada incandescente de 25 watts na sala de teste, de modo que a luminosidade nos braços abertos do labirinto para os grupos

testados (experimental e controle) ficasse na faixa de 14 a 16 lx. Duas lâmpadas de LED fixadas 30 cm acima do piso do interior de cada braço fechado que foram posicionadas e devidamente reguladas de forma que a luminosidade que incidiu no interior destes braços ficasse na faixa dos 230 a 626 lx (Figura 1). Foram escolhidas lâmpadas de LED por elas não produzirem calor, de modo que apenas a luz emitida pudesse influir no comportamento dos ratos.

A altura das paredes dos braços fechados foi aumentada adicionando-lhes prolongamentos, de modo que a luminosidade intensa proveniente das lâmpadas de LED não incidisse nos braços abertos. Próximo ao centro do LCE dois anteparos de madeira auxiliaram a diminuir a incidência de luz no centro do aparato, de modo que nesse espaço a luminosidade ficasse em 128 lx – uma tentativa de deixar o quadrante com luminosidade intermediária entre a dos braços fechados e a dos abertos.

As sessões foram filmadas com uma câmera digital posicionada acima do aparato experimental (2,4 m). Após a testagem de cada sujeito, o aparato foi higienizado com uma solução de etanol diluída à 5% e seco com toalhas de papel, evitando assim a influência de pistas olfativas entre os sujeitos. As medidas comportamentais foram analisadas utilizando o *software* X-Plo-Rat 1.1.0 (Chaim & Morato, 2005).

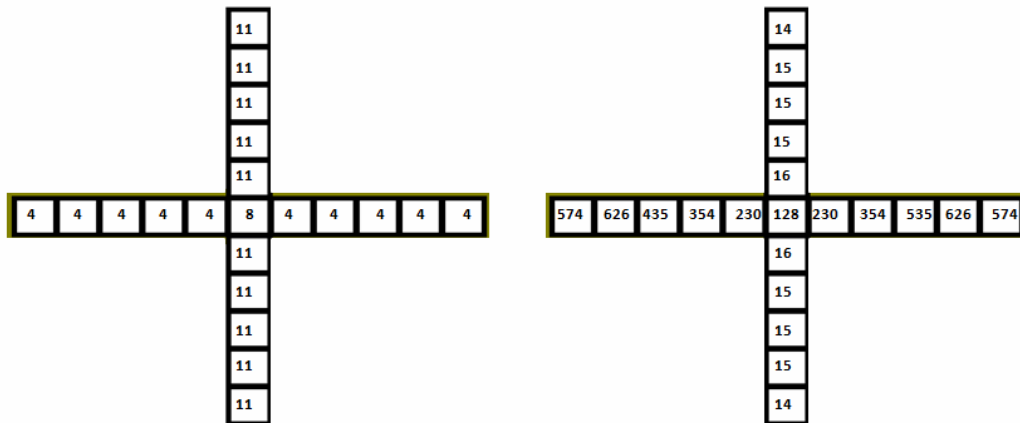


Figura 1 – À esquerda, encontra-se uma representação esquemática que revela a taxa de luminosidade (em lux) que incidiu em cada quadrante do LCE convencional sob uma luz de sala de 25 watts. À direita, encontra-se uma representação esquemática que revela a taxa de luminosidade (em lux) que incidiu em cada quadrante do labirinto sob uma luz de sala de 25 watts e sob o efeito de luzes de LED dentro dos braços fechados do LCE.

2.3 Delineamento e procedimento

Os ratos foram distribuídos entre dois grupos (grupo controle [CTL] e grupo experimental [ILU]). O grupo CTL (n=10) foi submetido ao labirinto em cruz elevado convencional sob uma luz de sala de 25 watts e o grupo ILU (n=9) foi submetido ao labirinto modificado com luzes de LED incidindo no interior dos braços fechados e sob a mesma luz de sala de 25 watts. No dia do teste os ratos foram pesados e habituados por 1 hora na antessala de testagem do labirinto em cruz elevado. Os ratos foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para dentro de um dos braços fechados e a sessão de ambos os grupos foi filmada por 20 minutos para a posterior análise do curso temporal das medidas comportamentais no labirinto.

2.4 Medidas comportamentais

O número de episódios dos seguintes comportamentos foi mensurado: As *stretched attend postures* (posturas esticadas – *SAP*), ocorrem quando o rato estica o corpo com as patas dianteiras e cabeça para frente enquanto mantém as patas traseiras fixas, seguido do retorno do corpo a posição inicial. O *rearing* (levantar-se) consiste em erguer-se por meio das patas traseiras. O *head dipping* (mergulho de cabeça) consiste em parar na borda da plataforma e inclinar a cabeça para baixo do braço fechado (nível dos olhos deve estar abaixo da superfície do braço).

Também foi registrado o número de entradas e o tempo que o rato passou nos braços abertos e fechados e o tempo no centro do LCE. Registrou-se ainda a duração e frequência do *grooming* rostral, a duração do *grooming* corporal e o número de cadeias estereotipadas de *grooming*.

2.4.1 *Grooming*

O comportamento de *grooming* foi dividido em duas categorias, tal como descritas nos trabalhos de Komorowska & Pellis (2004) e Estanislau e colaboradores (2013):

1 – *Grooming* rostral: movimentos de fricção com as patas dianteiras (incluindo lambidas nessas patas) em direção ao nariz, focinho, cabeça e orelhas.

2 – *Grooming* corporal: toda a ação direcionada à limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, os genitais e a cauda. As coçadas no corpo (seguidas de lambidas) com as patas traseiras também foram consideradas pertencentes a essa categoria.

Um episódio de *grooming* foi composto pela soma do tempo de *grooming* rostral e corporal e de interrupções menores do que 5 segundos. Interrupções maiores do que 5

segundos marcaram um novo episódio de *grooming* e o tempo total de *grooming* consistiu na soma do tempo de todos os episódios.

O *grooming* também foi avaliado em relação à frequência de cadeias estereotipadas, sendo a cadeia composta pelas seguintes fases: *Fase 1*: série de vigorosos movimentos simétricos em forma de elipse em volta do focinho, onde as patas dianteiras seguem alternando entre trajetórias de movimentos maiores e menores. *Fase 2*: série de movimentos unilaterais, cada um envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas mistaciais abaixo dos olhos. Os ratos também costumam fazer movimentos híbridos das Fases 1 e 2, em que uma pata faz o movimento unilateral da Fase 2, enquanto a outra faz um curto movimento elíptico da Fase 1. *Fase 3*: série de movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente com ambas as patas friccionando-as com a parte superior da cabeça. As patas podem chegar a se estender por trás em direção ao pescoço e darem a volta para cima, subindo o suficiente para passarem por cima das orelhas, em seguida, deslizando juntas em direção à frente da face. *Fase 4*: movimentos prolongados de lambidas de regiões ventrais e laterais do tronco. Também foi considerado como uma cadeia, quando o rato executou as Fases 1 e 2 e passando para a Fase 4, ou quando ele executou as Fases 1, 2 e 3 e repetiu a Fase 1 (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005).

2.5 Análises dos dados

Os grupos foram comparados quanto ao tempo e porcentagem nos braços abertos, tempo e número de entradas nos braços fechados e tempo no centro do LCE. Adicionalmente, foi avaliada a frequência de *rearing*, a duração e porcentagem do *grooming* rostral, a duração do *grooming* corporal e o número de cadeias estereotipadas de *grooming*. O *head dipping* e o *SAP* foram avaliados quanto à sua porcentagem de ocorrência na área protegida. Considerou-

se como área protegida os braços fechados e o centro do labirinto, enquanto os braços abertos foram considerados como área não protegida (Rodgers & Johnson, 1995).

No intuito de analisar o curso temporal das respostas comportamentais aos testes, os 20 minutos das sessões no labirinto foram divididas em quatro blocos com duração de 5 minutos cada. Os dados obtidos foram analisados para definir se a distribuição é normal e homogênea, respectivamente, por meio do teste Shapiro-Wilk e do teste de Levene.

Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, a análise paramétrica foi conduzida (análise de variância de duas vias para medidas repetidas [ANOVA]) para a avaliação dos fatores *iluminação* (controle X iluminado) e *blocos de tempo* (4 blocos de 5 min), seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação entre os dois grupos. Para comparações entre os blocos dentro do mesmo grupo, foi utilizado ANOVA de Friedman, seguido pelo teste pareado de Wilcoxon para comparações entre pares de blocos. Para todos os casos foi adotado um intervalo de confiança de $p \leq 0,05$.

3 Resultados

Referente ao tempo total nos braços abertos (Figura 2 – A), o teste Mann-Whitney não apontou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Quanto à comparação entre os grupos bloco a bloco, o teste apontou diferença estatística significativa somente no segundo bloco, que se revelou maior no grupo experimental. Referente à comparação entre blocos do mesmo grupo, o teste ANOVA de Friedman indicou diferença estatística significativa, tanto no grupo controle ($\chi^2_{[3]}=11,602$; $p < 0,05$) como no experimental ($\chi^2_{[3]}=14,379$; $p < 0,05$). O teste Wilcoxon apontou diferença estatisticamente significativa no grupo controle entre todos os blocos, com exceção dos blocos 2 e 3, o que indica decréscimo gradual do tempo nos braços abertos a partir do primeiro bloco. O teste Wilcoxon para dados pareados apontou diferença no grupo experimental no bloco 2 que é maior do que o bloco 3 e 4, mas não apontou diferença estatisticamente significativa entre os blocos 3 e 4, o que indica decréscimo entre o segundo e terceiro blocos, seguido de estabilização no final da sessão.

O grupo experimental passou menos tempo nos braços fechado do que o grupo controle (Figura 2 – C) (Mann-Whitney, $p < 0,05$). O teste apontou diferença significativa entre os grupos no segundo, terceiro e quarto blocos, que se mostraram maiores no grupo controle. Na comparação entre os blocos intragrupos, a ANOVA de Friedman indicou efeito estatisticamente significativo para o grupo controle ($\chi^2_{[3]}=12,360$; $p < 0,05$), mas não para o experimental ($\chi^2_{[3]}=0,733$; $p > 0,05$). O teste Wilcoxon para dados pareados apontou diferença no grupo controle entre o bloco 1 e os demais blocos e entre o segundo e quarto blocos, o que indica pequeno aumento do tempo nos braços fechados ao longo da sessão.

A ANOVA não revelou efeito estatisticamente significativo da iluminação na frequência total de entradas nos braços fechados ($F_{[1,17]}=0,318$; $p > 0,05$) (Figura 2 – B). Quanto ao efeito dos blocos de tempo foi encontrado efeito significativo ($F_{[3,51]}=67,722$; $p < 0,0001$), bem como constatou-se efeito significativo da interação dos dois fatores

($F_{[3,51]}=3,166$; $p<0,05$). No entanto, a análise *post hoc* de Duncan não apontou diferença entre os grupos referente a cada bloco de tempo, embora aponte que ambos os grupos apresentem redução gradual nos primeiros blocos, excetuando-se os dois últimos blocos que não diferem – um indicativo de estabilização da resposta no último bloco da sessão.

Concernente ao tempo total da sessão despendido no centro do labirinto (Figura 2 – D), o grupo experimental mostrou índices superiores ao grupo controle (Mann-Whitney, $p<0,05$). O teste apontou também diferença significativa entre os dois grupos nos blocos 2 e 3, que se mostraram maiores no grupo experimental. Ressalta-se ainda que no quarto bloco foi encontrada um valor de $p=0,06$, um índice não significativo, mas próximo do nível de significância. Na análise intragrupo, o teste ANOVA de Friedman não demonstrou diferença significativa dos blocos de tempo, tanto no grupo controle ($\chi^2_{[3]}=7,320$; $p>0,05$) como no experimental ($\chi^2_{[3]}=3,000$; $p>0,05$).

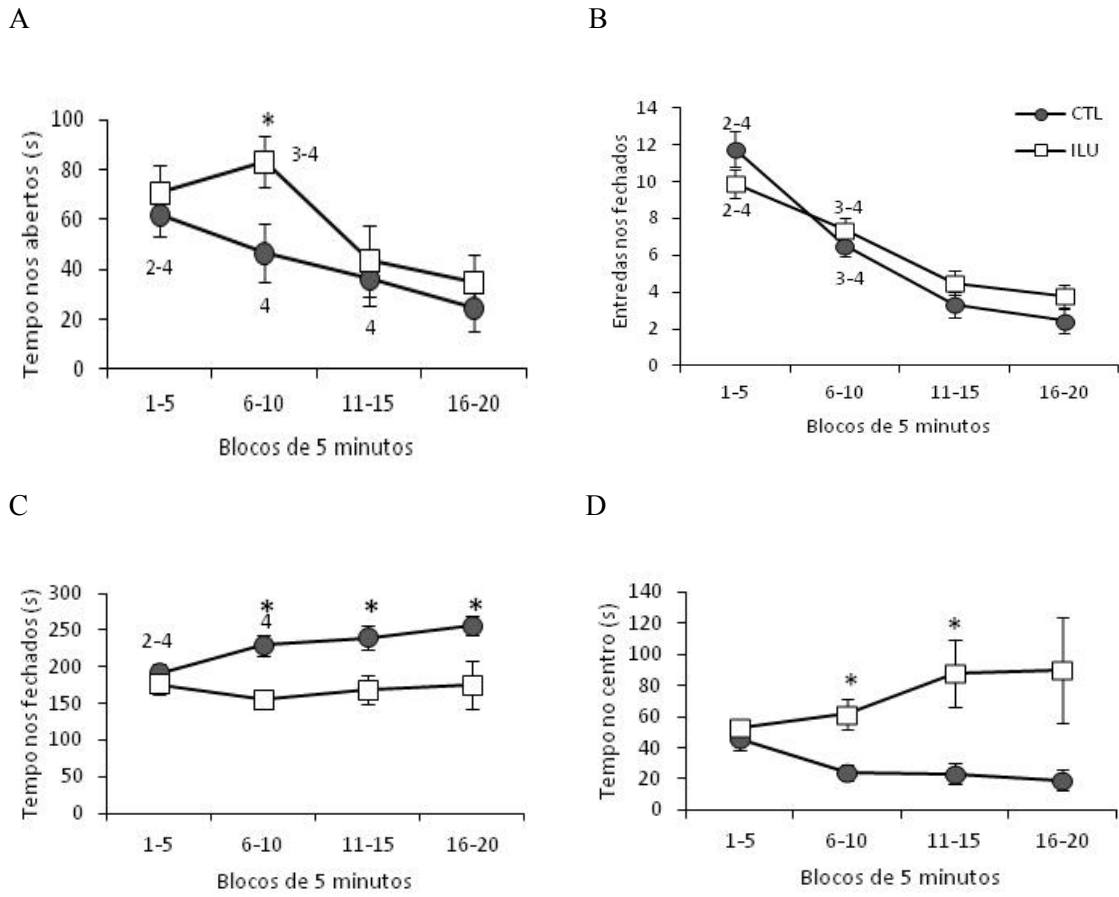


Figura 2 – Medidas de tempo nos braços abertos (A), frequência de entradas nos fechados (B), tempo nos fechados (C) e tempo no centro (D). Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). Estão representados os fatores iluminação intensa nos braços fechados (ILU) e iluminação ambiente da sala (CTL). * ($p < 0,05$) em comparação ao outro grupo. ⁿ $p < 0,05$ em comparação ao n ésimo bloco do mesmo grupo.

A ANOVA apontou efeito significativo da iluminação sobre a duração do *grooming* rostral, que se mostrou menor no grupo experimental em relação ao controle ($F_{[1,17]}=5,663$; $p < 0,05$) (Figura 3 – A). Não foi detectado, porém, efeito dos blocos de tempo ($F_{[3,51]}=0,811$; $p > 0,05$), nem tampouco efeito estatisticamente significativo da interação dos fatores iluminação e blocos de tempo ($F_{[3,51]}=0,881$; $p > 0,05$). Já no que se refere ao tempo total de *grooming* corporal, o Mann-Whitney apontou diferença significativa entre os grupos, sendo maior a duração do grupo controle ($p=0,05$). No entanto, o teste apontou diferença significativa entre os dois grupos apenas no penúltimo bloco (Figura 3 – B). Na comparação

entre os blocos do grupo controle a ANOVA de Friedman indicou efeito significativo ($\chi^2_{[3]}=19,181$; $p<0,05$). O teste Wilcoxon para dados pareados apontou diferença no grupo controle entre todos os blocos, exceto entre os dois últimos, o que indica o aumento gradual do componente corporal do *grooming* na maior parte da sessão, seguido de sua estabilização. Na comparação entre os blocos do grupo experimental, a ANOVA de Friedman indicou efeito significativo ($\chi^2_{[3]}=10,275$; $p<0,05$). O teste Wilcoxon para dados pareados apontou efeito para o terceiro e quarto blocos, que são maiores do que o primeiro bloco, o que indica um aumento do *grooming* corporal a partir do terceiro bloco de sessão e que se manteve estável até o final.

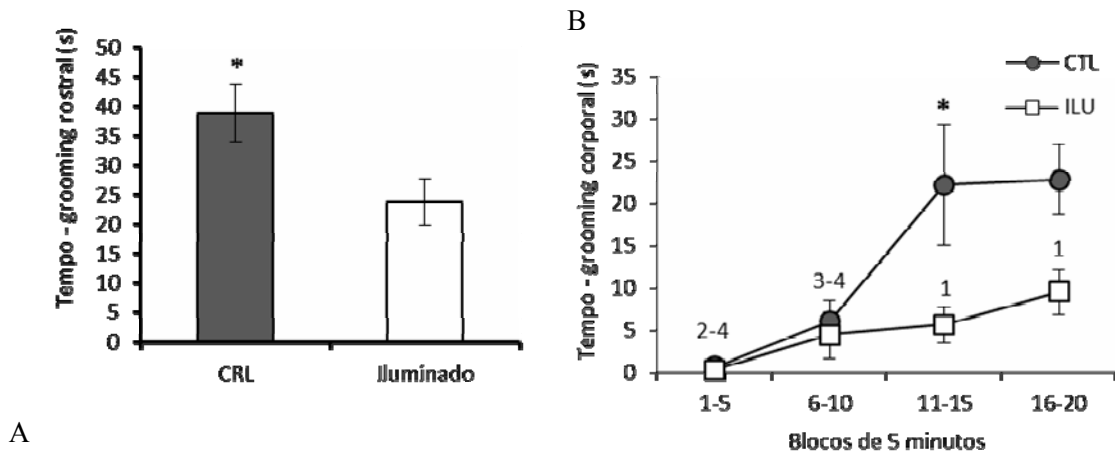


Figura 3 – Medidas de *grooming* rostral (A) e corporal (B). Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). Estão representados os fatores iluminação intensa nos braços fechados (ILU) e iluminação ambiente da sala (CTL). * ($p<0,05$) em comparação ao outro grupo. ⁿ $p<0,05$ em comparação ao enésimo bloco do mesmo grupo.

Tabela 1: Médias e erro padrão de outras medidas no labirinto em cruz elevado.

		Blocos (min)				Total
		1-5	6-10	11-15	16-20	
% de entradas nos abertos	CTL	32,1 ± 3,0	26,1 ± 5,6	28,4 ± 6,1	18,4 ± 6,5	28,6 ± 3,7
	ILU	33,3 ± 5,1	44,5 ± 4,8	32,6 ± 9,1	30,1 ± 8,0	39,1 ± 4,3
% de head dipping no espaço protegido	CTL	35,5 ± 6,8	40,6 ± 8,6	50,6 ± 9,5	42,6 ± 10,8	38,3 ± 5,4
	ILU	31,5 ± 4,9	35,0 ± 6,8	51,6 ± 10,7	51,0 ± 11,3	35,2 ± 3,8
% de SAP no espaço protegido	CTL	72,5 ± 7,3	75,3 ± 5,4	81,1 ± 7,2	74,4 ± 9,6	75,0 ± 5,1
	ILU	71,7 ± 5,8	62,5 ± 5,7	60,4 ± 11,2	71,0 ± 10,6	69,5 ± 3,6
% de <i>grooming</i> rostral	CTL	80,4 ± 10,5	72,3 ± 9,2	33,7 ± 8,6	33,7 ± 8,5	48,2 ± 5,4
	ILU	93,7 ± 5,1	82,6 ± 8,2	64,0 ± 10,1	38,7 ± 11,4	56,0 ± 8,9
Freq. de cadeias estereotipadas de <i>grooming</i>	CTL	0,3 ± 0,2	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,4	3,9 ± 0,7
	ILU	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	2,8 ± 0,4

4 Discussão

O presente estudo teve por objetivo desenvolver e testar a capacidade de um procedimento adaptado de conflito no LCE em prolongar o período de aversividade experimental em sessões de 20 minutos no teste. De uma maneira geral, entende-se o procedimento como bem sucedido com base no maior tempo gasto no centro pelos animais do novo procedimento, em comparação aos sujeitos controle. Isso atesta para o potencial de estender o conflito. O procedimento, embora reduza a duração do *grooming*, também não o suprime completamente, o que ainda permite mantê-lo como uma das medidas alvo para tratamento farmacológico em futuros estudos.

No estudo, a porcentagem e tempo total de permanência nos braços abertos não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Ressalta-se que na comparação entre os grupos bloco a bloco, a exceção recai sobre o segundo bloco de sessão do tempo nos braços abertos. Somado a observação de que a duração do *grooming* apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente a partir do terceiro bloco de sessão, sugere-se que o maior tempo passado nos braços abertos no segundo bloco pode ter contribuído para o efeito supressor no *grooming* nessa resposta. Excetuando-se o segundo bloco, ambos os grupos demonstraram queda geral no tempo passado nos braços abertos ao longo da sessão.

Também não foi observado efeito do procedimento modificado de conflito na locomoção dos ratos, uma vez que, embora tenha havido interação entre iluminação e blocos de tempo, os grupos mostraram semelhante redução gradual na frequência de entradas nos braços fechados. Somada a estabilidade do *head dipping* e a redução gradual na frequência de *rearing* nos dois grupos, infere-se a ocorrência de habituação locomotora ao longo da sessão.

No presente estudo, o tempo que os ratos do grupo ILU passaram nos braços fechados foi menor do que os do grupo CTL. Adicionalmente, observou-se que os ratos do grupo ILU apresentaram no segundo e terceiro blocos de sessão uma maior preferência pelo centro do labirinto em comparação aos sujeitos controle. Ambos os grupos demonstraram estabilidade no tempo em que ficaram no centro ao longo da sessão. Esses achados sugerem uma maior manutenção do potencial conflito experimentado pelos animais ao longo do período prolongado de teste.

No que diz respeito ao *grooming*, a duração total do *grooming* rostral e corporal foi menor no grupo ILU em relação ao CTL, o que indica um efeito aversivo da iluminação.

Nesse mesmo grupo, o *grooming* corporal teve um pequeno aumento nos dois últimos blocos de sessão, ao passo que no grupo controle foi observado o aumento gradual desde o primeiro bloco. Este aumento condiz com a concepção de que o componente corporal seria um indicativo de *dearousal* frente a estressores ambientais (Estanislau, Dízas-Morán, Cañete, Blázquez & Tobeña, 2013; Veloso, 2012) – efeito que se apresentou mais retardado no grupo experimental, possivelmente em decorrência da intensa iluminação. Somada à observação de que as diferenças entre os grupos só é significativa no terceiro bloco, sugere-se que a iluminação exerceu um efeito supressor moderado do componente corporal do *grooming* do grupo ILU em comparação ao CTL. Isso é válido, sobretudo, quando tomada como parâmetro a supressão do *grooming* em outros testes com sessão prolongada e em que são utilizados estressores mais intensos, como testes que fazem uso de choques elétricos com esQUIVA ativa (Estanislau, Díaz-Morán, Cañete, Blázquez & Tobeña, 2013) e a extinção operante (Veloso, 2012). Sugere-se, portanto, que o procedimento é moderada e constantemente aversivo ao longo de sessões mais longas de teste, o que condiz com a proposta do presente estudo.

Embora considere-se que o *grooming* ocorra em locais isentos de estimulação aversiva ou em que o rato já se encontra habituado, o centro do labirinto modificado aparentemente não se revelou um local menos aversivo para a ocorrência do *grooming*. Um rato de cada um dos grupos do estudo apresentou um único episódio de *grooming* no centro do labirinto. Uma vez que o centro menos iluminado que os braços fechados do grupo ILU não se mostrou útil para a visualização do *grooming*, estudos posteriores poderiam avaliar o efeito de um LCE que se utilize de uma alta intensidade de iluminação em toda a região protegida, sem excluir o centro. Isso permitiria avaliar se, mesmo sem essa região presumivelmente menos aversiva do labirinto modificado, ainda assim a ocorrência e estrutura do *grooming* seria semelhante. Tal alteração possivelmente induziria uma maior aversividade ao longo da sessão.

O procedimento desenvolvido neste estudo induziu nos ratos do grupo ILU uma maior preferência pelo centro do labirinto em comparação aos sujeitos controle. O procedimento também induziu a redução da duração total do *grooming* (rostral e corporal) do grupo ILU em relação ao CTL. Cabe apontar que o procedimento não reduziu sua duração na mesma proporção à observada em estudos que empregam estressores intensos – o que pode eventualmente possibilitar a observação de efeitos de fármacos nas medidas de *grooming*. Tal procedimento pode, portanto, ser útil para futuras análises dos comportamentos do rato sob o efeito de determinados fármacos, sobretudo, quando se observa uma aparente estabilidade no conflito induzido por um período prolongado de teste. Fármacos com efeito ansiolítico poderiam ser empregados para futuras análises, em particular, os antidepressivos da classe dos

ISRS, uma vez que a serotonina é um neurotransmissor que tem sido relacionado ao processo de tomada de decisão e ao conflito (Homberg, 2012). Adicionalmente, o procedimento pode possuir potencial de impedir a tolerância de primeira passagem ao LCE, dado a relativa semelhança deste procedimento com o desenvolvido por Pereira e colaboradores (1999), o que torna necessário futuros testes sobre o efeito de fármacos benzodiazepínicos em repetidas exposições ao labirinto.

Referências

- Aouizerate, B., Guehl, D., Cuny, E., Rougier, A., Bioulac, B., Tignol, J., & Burbaud, P. (2004). Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: a necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Progress in Neurobiology*, *72*, 195-221.
- Aupperle, R. L., & Paulus, M. P. (2010). Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. *Clinical research*, *12*, 517-531.
- Bouwknicht, J. A., Spiga, F., Staub, D. R., Hale, M. W., Shekhar, A., & Lowry, C. C. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin*, *72*, 32-43.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and tourette's syndrome. *BMC Biology*, *3*(4), 1-16.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analysis of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, *29*(8), pp. 193-205.
- Chaim, K. T., Morato, S. (2005). Software X-Plo-Rat, Versão 1.1.0.
- Crawley, J. N., & Goodwin, F. K. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*; *13*, 167-70.
- Crawley, J. N. (1981). Neuropharmacological specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. *15*, 695-9.
- Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high-and-low avoidance rats. *Neuroscience Research*, *77*, 187-201
- Enginar, N., Hatipoğlu, I., & Firtina, M. (2008). Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *89*, 450-455.
- File, S. E., Mabbutt, P. S., & Hitchcott, P. K. (1990). Characterization of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, *102*, 98-101.
- Graeff, F. G. (2005). Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo, SP: Atheneu.
- Greer, J. M., Capecchi, M. R. (2002). Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*, *33*, 23-24.

- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.
- Hainsworth, F. H. (1967). Saliva spreading, activity and body temperature regulation in the rat. *Am. J. Physiol.*, 212, 1288-1292.
- Homberg, J. R. (2012). Serotonin and decision making processes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 218-236.
- Kalueff, A., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioral stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143(2), 169-177.
- Komorowska, J., & Pellis, S. (2004). Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural Processes*, 67, 287-293.
- Korff, S., & Harvey, B. H. (2006). Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatric Clinics of North America*, 29(2), 371-390.
- Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., Merikangas, K. R., Walters, E. E. (2005). Prevalence, severity and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry*, 6, 617-627.
- Lepekhina, L. M., & Tsitsurina, E. A. (2009). Ontogenetic Development of Dopaminergic Regulation of Grooming Behavior in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 148(3), 363-365.
- Melcher, T., Falkai, P, Gruder, O. (2008). Functional brain abnormalities in psychiatric disorders : neural mechanisms to detect and resolve cognitive conflict and interference. *Brain Res. Rev.* 59, 96-124.
- Millan & Brocco. (2003). The Vogel conflict test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European Journal of Pharmacology*, 463, 67-96.
- Pellow, S, Chopin, P., File, S. E & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience*, 14, 149-167.
- Penades, R. (2007). Impaired response inhibition in obsessive-compulsive disorder. *Eur. Psychiatry*, 22, 404-410.
- Pereira, J. K., Vieira, R. J., Konishi, C. T., Ribeiro, R. A., Frussa-Filho, R. (1999). The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Sciences*, 65(10), 101-107.
- Ritter, R. C., & Epstein, A. N. (1974). Saliva lost by grooming: a major item in the rat's water economy. *Behav. Biol.* 11, 581-585.

- Ristvedt, S. L., Mackenzie, T. B., & Christenson, G. A. (1993). Cues to obsessive-compulsive symptoms: relationships with other patient characteristics. *Behaviour Research and Therapy*, *31*(8), 721-729.
- Rodgers, R., Davies, B., & Shore, R. (2002). Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes, Brain and Behavior*, *1*(4), 242-251.
- Rodgers, R. J., Johnson, J. T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *2*, 297-303.
- Stahl, S. M. (2000). *Essential Psychopharmacology: Neuroscientific basis and practical applications*. Ed. 2, Cambridge University Press.
- Schneider, P., Ho, Y. J, Spanagel, R, & Pawlak, C. R. (2011). A novel elevated plus-maze procedure to avoid the one-trial tolerance problem. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 43.
- Schulz, D., Buddenberg, T., & Huston, J. (2007). Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 625-634.
- Spruijt, B., van Hoof, J., & Gispen, W. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, *72*(3), 825-852.
- Stern, C.A.J., Carobrez, A.P., & Bertoglio, L.J. (2008). Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *90*, 545-550.
- Takao, K., & Miyakawa, T. (2006). Light/dark transition test for mice. *Journal of Visualized Experiments*, (1), e104., 1-3.
- van Erp, A. M., Kruk, M., Meelis, W., & Willekens-Bramer, D. (1994). Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*, *65*(1), 47-55.
- Veloso, A. W. N. (2012). Curso temporal e distribuição regional da autolimpeza de ratos em resposta a diferentes estressores ambientais. Dissertação apresentada como requisito para o título de mestre em análise do comportamento pela Universidade Estadual de Londrina, 01-54.