



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANO DAVID

**EFEITO DO MIDAZOLAM E DO PENTILENOTETRAZOL
NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS DE *GROOMING* EM
RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Londrina
2016

LUCIANO DAVID

**EFEITO DO MIDAZOLAM E DO PENTILENOTETRAZOL
NA MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS DE *GROOMING* EM
RATOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

David, Luciano.

Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol na modulação das respostas de grooming em ratos no labirinto em cruz elevado / Luciano David. - Londrina, 2016.
40 f. : il.

Orientador: Célio Roberto 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, 2016.

Inclui bibliografia.

1. grooming - Tese. 2. labirinto em cruz elevado - Tese. 3. ansiedade - Tese. 4. modelos animais de ansiedade - Tese. I. Célio Roberto Estanislau, Célio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

LUCIANO DAVID

**EFEITO DO MIDAZOLAM E DO PENTILENOTETRAZOL NA
MODULAÇÃO DAS RESPOSTAS DE *GROOMING* EM RATOS NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Felipe D'Alessandro Ferreira Corchs
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Guilherme Bracarense Filgueiras
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de outubro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver mais um período de grande crescimento em minha vida. A Nossa Senhora do Desterro, aos anjos e santos pela intercessão e acompanhamento nos tantos momentos de descobertas e superação.

Agradeço à toda a minha família e, de maneira especial, aos meus queridos pais por todo apoio dado às minhas escolhas, pelos exemplos de honestidade, dedicação e amor incondicional.

Obrigado ao meu orientador Prof. Dr. Celio Estanislau pela atenção, paciência e todo o suporte nestes dois anos de trabalho.

Aos amigos de longa data e àqueles que o mestrado me deu a felicidade de conquistar, expresso toda a minha gratidão. Aos que se tornaram uma segunda família: Gabi, Ka, Laís, Lud, Mayron e Marcela, meu carinho por cada um é imenso, e nossa amizade significa muito para mim!

Obrigado aos colegas e amigos do laboratório. Thiago, Andresa, Iury, Aline, Kiko, Acauã, Daniel, Guilherme Borges, Gabriel, Taimon e todos do grupo de pesquisa em psicobiologia que compartilharam comigo esse tempo de aprendizado. Minha gratidão especial ao Guilherme Filgueiras e ao Rodrigo pelas valiosas contribuições à minha pesquisa.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

DAVID, Luciano. **Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol na modulação das respostas de *grooming* em ratos no labirinto em cruz elevado.** 2016 40f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O comportamento de *grooming* em roedores pode ser induzido por estressores mas, tem sido pouco explorado nos modelos animais de ansiedade. Estudos recentes, no entanto, têm sugerido que a avaliação de algumas medidas desse comportamento pode revelar dados sobre a ansiedade. Para avaliar uma relação entre ansiedade e *grooming*, o presente estudo propôs a testagem do efeito de uma droga ansiolítica (midazolam) e de uma droga ansiogênica (pentilenotetrazol) sobre suas medidas, em um modelo pré-clínico amplamente utilizado para o estudo da ansiedade em ratos, o labirinto em cruz elevado (LCE). Foram utilizados 40 ratos Wistar machos distribuídos em 3 grupos aleatoriamente, sendo um grupo controle, que recebeu salina, e dois grupos experimentais, que receberam midazolam (1 mg/Kg) ou pentilenotetrazol (10 mg/Kg). O experimento consistiu na exposição dos animais ao teste do LCE em 3 sessões repetidas e prolongadas de 20 minutos, separadas por intervalos de 24 horas. Os resultados apontaram que tanto nos 5 minutos iniciais da primeira sessão, que corresponde ao tempo de testagem convencional no LCE, quanto nas sessões prolongadas não foi encontrado um efeito significativo de droga nas medidas tradicionais de ansiedade avaliadas pelo modelo. Também foi visualizado um possível comprometimento da atividade locomotora nos animais tratados com o midazolam, indicando que a dose utilizada no estudo pode ter produzido um efeito sedativo. Com relação às medidas de *grooming*, o midazolam reduziu seus componentes rostral e corporal e o pentilenotetrazol apenas o corporal. Embora também possa ser afetado pelo efeito sedativo de fármacos, o *grooming* demonstrou indicativos de que pode ser uma medida útil para a avaliação da ansiedade em ratos, sendo notória sua variação por meio de uma droga ansiolítica ou ansiogênica.

Palavras-chave: *Grooming*. Labirinto em cruz elevado. Ansiedade. Modelos animais de ansiedade.

DAVID, Luciano. **Effect of midazolam and pentylenetetrazole in the modulation of grooming responses in rats in the elevated plus maze.** 2016. 40p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina , 2016.

ABSTRACT

The grooming behavior in rodents can be induced by stressors but it has not been widely explored in animal models of anxiety. Recent studies, however, have suggested that the evaluation of some measures of this behavior might reveal information on anxiety. To evaluate the relationship between anxiety and grooming, the present study tested the effect of an anxiolytic drug (midazolam) and an anxiogenic drug (pentylenetetrazol) on its measurements in a preclinical model widely used for the study of anxiety rats, the elevated plus maze (EPM). Forty male Wistar rats were randomly distributed into three groups, including control, which received saline, and two experimental groups receiving midazolam (1 mg/kg) or pentylenetetrazole (10 mg/ kg). The experiment consisted of exposing the animal to the EPM in 3 repeated and prolonged sessions of 20 minutes, separated by 24-hour intervals. The results showed that both during the first 5 minutes of the first session, which is the conventional testing time in the EPM, as well as in the extended sessions no significant effect of the drug on the traditional measures of anxiety assessed by the model was found. It was also displayed a possible impairment of locomotor activity in animals treated with midazolam, indicating that the dose used in the study may have produced a sedative effect. Regarding grooming measures, midazolam reduced the rostral and body components while pentylenetetrazol, only body grooming. Although it may also be affected by sedative drugs, grooming has shown indications that it can be a useful measure for the evaluation of anxiety in rats, with notable variation by means of an anxiolytic or anxiogenic drug.

Keywords: Grooming. Elevated plus maze. Anxiety. Animal models of anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Medidas comportamentais (média \pm erro padrão da média) dos primeiros 5 min no LCE de ratos tratados com salina (SAL) ou midazolam (MDZ). *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL (teste t)	18
Figura 2 – Medidas comportamentais (média \pm erro padrão da média) dos primeiros 5 min no LCE de ratos tratados com salina (SAL) ou Pentilenotetrazol (PTZ). *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL (teste t).....	20
Figura 3 – Média \pm erro padrão de medida porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE.....	21
Figura 4 – Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido nos braços abertos do LCE.....	21
Figura 5 – Média \pm erro padrão de medida de SAP no LCE.....	22
Figura 6 – Média \pm erro padrão do número de entradas nos braços fechados do LCE	23
Figura 7 – Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de <i>grooming</i> em seu componente rostral. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em cada sessão.....	24
Figura 8 – Média \pm erro padrão do tempo despedindo no comportamento de <i>grooming</i> em seu componente corporal. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em cada sessão (Mann-Whitney: $p < 0,05$). (#) Diferença entre as sessões 1 e 3 do mesmo tratamento (SAL) (Dunn: $p < 0,05$).....	25
Figura 9 – Média \pm erro padrão do tempo despendido nas diferentes formas do comportamento de <i>grooming</i> . (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em todas as sessões	26
Figura 10 – Média \pm erro padrão de medida de porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE.....	27
Figura 11 – Média \pm erro padrão de tempo despendido nos braços abertos do LCE	28
Figura 12 – Média \pm erro padrão de medida de SAP no LCE.....	28
Figura 13 – Média \pm erro padrão de medida do número de entradas nos braços fechados do LCE	29

Figura 14 – Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento <i>grooming</i> em seu componente rostral. (#) $p < 0,05$30
Figura 15 – Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de <i>grooming</i> em seu componente corporal. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos PTZ e SAL em cada sessão. (#) Diferença entre as sessões 1 e 3 do mesmo tratamento (SAL e PTZ).....	.31
Figura 16 – Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de <i>grooming</i> em seus componentes rostral e corporal32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDZ	Midazolam
PTZ	Pentilenotetrazol
OTT	Fenômeno de <i>One-trial tolerance</i>
SAP	Avaliação de risco (<i>stretched attend postures</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	MÉTODO	14
	Sujeitos	14
	Equipamentos e Procedimento	14
	Análise de dados	15
3	RESULTADOS	17
4	DISCUSSÃO	33
	REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

A ansiedade pode ser definida como uma resposta emocional básica e essencial dentro do repertório afetivo (Peregrino, 1997). No entanto, quando esta ultrapassa os níveis da normalidade, manifestam-se alterações somáticas, comportamentais e psicológicas que podem comprometer significativamente o desempenho individual em atividades cotidianas. Quando a ansiedade atinge este nível, passa a ser considerada como patológica, sendo denominada de primária, se for a manifestação principal do quadro clínico, e de secundária se for decorrente de outras enfermidades de natureza psiquiátrica ou não. Tendo em vista que esta última tende a desaparecer na medida em que a doença que lhe originou for tratada, são denominados de transtornos de ansiedade apenas aqueles nos quais a ansiedade é a principal manifestação sintomatológica (Graeff & Guimarães, 1999). De acordo com a quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-5, American Psychiatric Association, 2014), a ansiedade patológica não é um fenômeno unitário, mas um grupo de diferentes condições clínicas, como o transtorno de pânico, de ansiedade generalizada, de estresse pós-traumático e fobias. É adequado ressaltar também que estes transtornos de ansiedade são tratados com medicações diferentes (Argyropoulos, Sandford, & Nutt, 2000; Millan, 2003).

Dentre os modelos pré-clínicos empregados na investigação de aspectos da ansiedade em roedores, está o labirinto em cruz elevado (LCE), construído a partir da modificação de um procedimento introduzido há mais de seis décadas por Montgomery (1955), e que foi inicialmente proposto por Handley e Mithani (1984). O aparato é constituído por uma plataforma em forma de cruz, elevada a 50cm em relação ao solo, tendo dois braços opostos abertos e dois braços opostos fechados lateralmente. Através desse equipamento, o animal é colocado sob uma condição na qual se confrontam a tendência natural de exploração do ambiente novo, comportamento que caracteriza ansiólise, e a de permanecer em um ambiente

seguro, representado pelos braços fechados, condição que caracteriza ansiogênese. Dessa forma, o animal explora os dois tipos de braço, contudo tende a entrar com maior frequência e permanecer por mais tempo nos braços fechados. A exploração dos braços abertos é considerada um índice fidedigno de ansiedade, sendo que quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nestes espaços (Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986).

Ainda que a situação de teste seja aparentemente simples, muitos fatores exercem influência na aversão aos braços abertos. Alguns deles são inerentes ao sujeito, como idade e sexo, incluindo diferenças encontradas, por exemplo, no ciclo estral (Gouveia & Morato, 2002). Outros, no entanto, dizem respeito ao procedimento experimental, como a administração de drogas, ou ainda, submissão a uma única ou múltiplas exposições ao labirinto (Imhof, Coelho, Schmitt, Morato, & Carobrez, 1993; Bertoglio & Carobrez, 2004; Griebel, Moreau, Jenck, Martin, & Misslin, 1993).

Em relação às múltiplas exposições ao LCE, uma consequência comum está no aparecimento do fenômeno chamado *One-Trial Tolerance* (OTT). Este é caracterizado por um aumento na esquia dos braços abertos a partir de uma reexposição, isto é, redução da porcentagem do número de entradas, da porcentagem do tempo de permanência nestes espaços, e, conseqüentemente, comprometimento do efeito ansiolítico de drogas (File, Mabbut, & Hitchcott, 1990). É importante salientar que drogas ansiolíticas, como os benzodiazepínicos, produzem um aumento seletivo na exploração dos braços abertos no LCE, e em muitos estudos, foi observada a ocorrência do fenômeno de OTT envolvendo especificamente essa classe de fármacos, incluindo o clordiazepóxido, o diazepam e o midazolam (File et al., 1990; Bertoglio & Carobrez, 2004).

Além das medidas convencionais avaliadas no teste do LCE, que consiste na exploração dos braços abertos e fechados, o modelo também possibilita a avaliação de outros

parâmetros comportamentais, como o esticar-se, o levantar-se e a auto-limpeza, também conhecida como *grooming*.

O comportamento de *grooming* exerce uma função essencial no cuidado e proteção da superfície do corpo, mas sua ocorrência também pode ser explicada a partir do contexto em que o animal está exposto, além de fatores individuais (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992). É também frequentemente observado em situações estressantes, sendo considerado importante na adaptação comportamental ao estresse e na redução da excitação (*dearousal*) (Kametani, 1988; Moyaho & Valencia, 2002).

Estanislau, Ramos, Ferraresi, Costa, Carvalho, & Batistela, (2011), destacam que no teste do LCE, é observado que a maior parte do comportamento de *grooming* é encontrado em ratos que espontaneamente mostram uma baixa exploração dos braços abertos, por sua vez, uma importante medida de avaliação de ansiedade neste modelo. Nesta linha, Estanislau (2012) frisa que sessões de cinco minutos no teste do LCE podem trazer resultados inconclusivos sobre as medidas de *grooming*, e que o prolongamento das sessões de cinco para dez minutos pode revelar dados não identificáveis em sessões convencionais. Dentre eles está um aumento no tempo total deste parâmetro na segunda metade do tempo de uma sessão de 10 min em que ratos foram expostos a uma prévia condição ansiogênica de confinamento nos braços abertos. Estes achados reforçam que, sob algumas condições, algumas medidas de *grooming* podem ser úteis para a avaliação da ansiedade. É válido salientar que mesmo não estando entre as principais medidas de ansiedade em estudos com roedores trazidas pela literatura, a utilidade desse parâmetro comportamental tem acumulado evidências, como pode ser conferido, por exemplo, em Kalueff e Tuohimaa (2005), com uma abordagem que avalia sua porcentagem de interrupções. A observação de episódios de *grooming* mostra que os mesmos são compostos por um número limitado de padrões comportamentais e que há certo grau de estereotipia em sua sequência (Berridge, Fentress, & Parr, 1987). Tipicamente, os

surtos de *grooming* se dirigem à superfície corporal externa em uma sequência cefalocaudal, e a cadeia de padrões deste comportamento que compreende a sequência patas dianteiras-focinho-cabeça-corpo é, por vezes, chamada de superestereotipia (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005).

Sobre a proposta de investigar a ansiedade a partir de uma medida ainda pouco explorada, é importante destacar que nas últimas décadas houve um crescente interesse tanto pela utilização como pelo desenvolvimento de modelos animais de transtornos comportamentais. Uma das motivações para a busca desses novos modelos ocorre devido aos diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos, frequentes nos estudos com humanos em determinados processos psicofisiológicos e psicopatológicos. A experimentação animal, mesmo que sujeita a intensas discussões sobre seus limites e atribuições, tem contribuído em grande escala para os avanços recentes alcançados em psicofarmacologia e no entendimento do funcionamento cerebral em diversos transtornos mentais/ emocionais (Zangrossi, 1997). Em acréscimo, diversas similaridades relacionam os sintomas de ansiedade observados em seres humanos à expressão de comportamentos defensivos em animais (Borsini, Podhorna, & Marazziti, 2002). Diante de tais informações, muitos pesquisadores têm feito a utilização de animais de laboratório como material de trabalho para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na neurobiologia do medo e da ansiedade (Graeff & Guimarães, 1999).

Mesmo com a existência de críticas e ressalvas metodológicas a grande parte dos modelos de avaliação do comportamento de ansiedade em roedores, é possível afirmar que, de um modo geral, eles são eficientes, desde que sejam utilizados corretamente (Kalueff, Wheaton, & Murphy, 2007). De acordo com Pires, Tufik, & Andersen (2012), esta é uma área em constante renovação e que está sob recorrentes reconsiderações teóricas, resultando na criação de novos modelos e adaptações daqueles já existentes. Nessa linha, os autores

salientam que são essas adaptações que garantem a aplicabilidade desses modelos animais às diversas condições experimentais.

Em muitos países, são enormes os gastos anuais com tratamentos para transtornos de ansiedade. Com efeito, um estudo recente indicou que a quantidade de pessoas que apresentam um ou mais transtornos de ansiedade ao longo de um ano passa de 18 % (Kessler, Chiu, Demler, Merikangas, & Walters, 2005). Porém, além do custo financeiro, há que se considerar o imensurável custo em termos de sofrimento e perda de qualidade de vida em que a ansiedade é implicada. Neste sentido, o presente trabalho está inserido no objetivo de validação de um modelo animal para ansiedade através da medida de *grooming* em contextos estressantes, buscando conhecer as diferentes formas de modular a resposta de *grooming* em ratos. De maneira específica, o estudo buscou avaliar como o midazolam e o pentilenotetrazol modulam a resposta de *grooming* ao teste do labirinto em cruz elevado em exposições repetidas e de duração prolongada de vinte minutos.

Um estudo feito recentemente em nosso laboratório indica que o prolongamento da sessão de teste pode revelar efeitos não-observáveis em sessões de 5 min (como costumam ser feitos estudos no LCE) (Estanislau, 2012). Assim, neste experimento, os efeitos do midazolam e do pentilenotetrazol foram avaliados em sessões prolongadas do labirinto em cruz elevado. Cada rato foi submetido a testes diários por 3 dias para que seja verificado se os efeitos sobre o *grooming* são estáveis com o re-teste ou se haveria o fenômeno conhecido como *one-trial tolerance* (Carobrez e Bertoglio, 2005).

A escolha das doses de 1mg/kg de midazolam e 10 mg/kg de pentilenotetrazol foi estabelecida com base em um experimento prévio realizado em nosso laboratório.

MÉTODO

Sujeitos

Foram utilizados 40 ratos machos de linhagem Wistar (250-350 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, experimentalmente inexperientes. Eles foram alojados em número de quatro por gaiola, mantidos sob temperatura média de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7h00 e apagadas às 19h00), com acesso a água e ração industrial *ad libitum*. O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Londrina entre as 14h00 e 18h00. Os procedimentos foram realizados conforme as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (proc. 32819.2013.61).

Equipamento e Procedimento

Os ratos foram distribuídos em três grupos aleatoriamente. Vinte minutos antes de cada sessão, 13 animais receberam injeção intraperitoneal de salina (10 ml/Kg), 14 de midazolam (1mg/Kg), e outros 13 de pentilenotetrazol (10mg/Kg). Vinte minutos após a injeção, cada rato foi testado num labirinto em cruz elevado convencional, com as seguintes dimensões e características:

Construído em madeira, com dois braços abertos e dois fechados por paredes laterais (altura: 50 cm). Os braços têm 50 cm de comprimento e 10 cm de largura e estão arranjados de modo que os do mesmo tipo localizem-se em lados opostos, unidos por um quadrado central de 10 x 10 cm. Os braços abertos são providos de bordas de acrílico (1,0 cm de altura), para se evitar quedas. O piso do labirinto dista 50 cm do chão e foi iluminado por uma lâmpada de 60 W, localizada acima do quadrado central. Previamente a cada sessão, o labirinto foi limpo com papel toalha e uma solução de etanol (5 %) e, então, seco. Cada rato foi posto no centro do labirinto com o focinho voltado para um dos braços fechados e seu comportamento foi

filmado (com uma filmadora afixada no teto exatamente acima do quadrado central) por 20 minutos. Além do *grooming* (ver sessão Avaliação de *grooming*), foram registradas a frequência e a duração das entradas nos diferentes braços, bem como as de levantadas (*rearing*), mergulhos de cabeça e esticadas com retorno à posição original (*stretched attend posture*).

Avaliação de grooming:

O comportamento de *grooming* foi mensurado quanto à sua frequência e tempo. Dois componentes foram discernidos: rostral e corporal:

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: limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, área genital e cauda. As coçadas no corpo (seguidas de lambidas) com as patas traseiras (*scratching*) também são consideradas pertencentes a essa categoria.

O tempo total de *grooming* é obtido pela soma do tempo de todos os episódios.

Os grupos foram comparados quanto ao número de episódios de *grooming*, sua duração total, duração do componente rostral e do corporal. As três sessões foram separadas por intervalos de 24 horas.

Análise de Dados

Foram realizadas análises sobre os parâmetros de porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, SAP (*stretched attend posture*), entradas nos braços fechados, e medidas de *grooming* (*grooming* rostral, corporal e total). A análise dos dados referentes aos primeiros 5 minutos da primeira sessão foi conduzida por meio do teste *t*. Quanto aos dados referentes às 3 sessões de 20 minutos que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, a análise paramétrica foi conduzida por meio de ANOVA de duas vias para

medidas repetidas seguida do teste *post hoc* de Duncan. Para os dados não-paramétricos foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o teste de Friedman seguido do teste de Dunn.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra os efeitos do midazolam dos primeiros 5 min da primeira sessão. De acordo com o teste *t*, houve efeito significativo da droga sobre as entradas nos braços fechados ($t_{[24]} = 3,335$; $p < 0,05$) e *grooming* rostral ($t_{[24]} = 3,741$; $p < 0,05$). Nas demais medidas, não houve efeito significativo. Diferentemente das sessões repetidas de 20 minutos, nos primeiros 5 minutos da primeira sessão, não foi emitido nenhum episódio de *grooming* corporal.

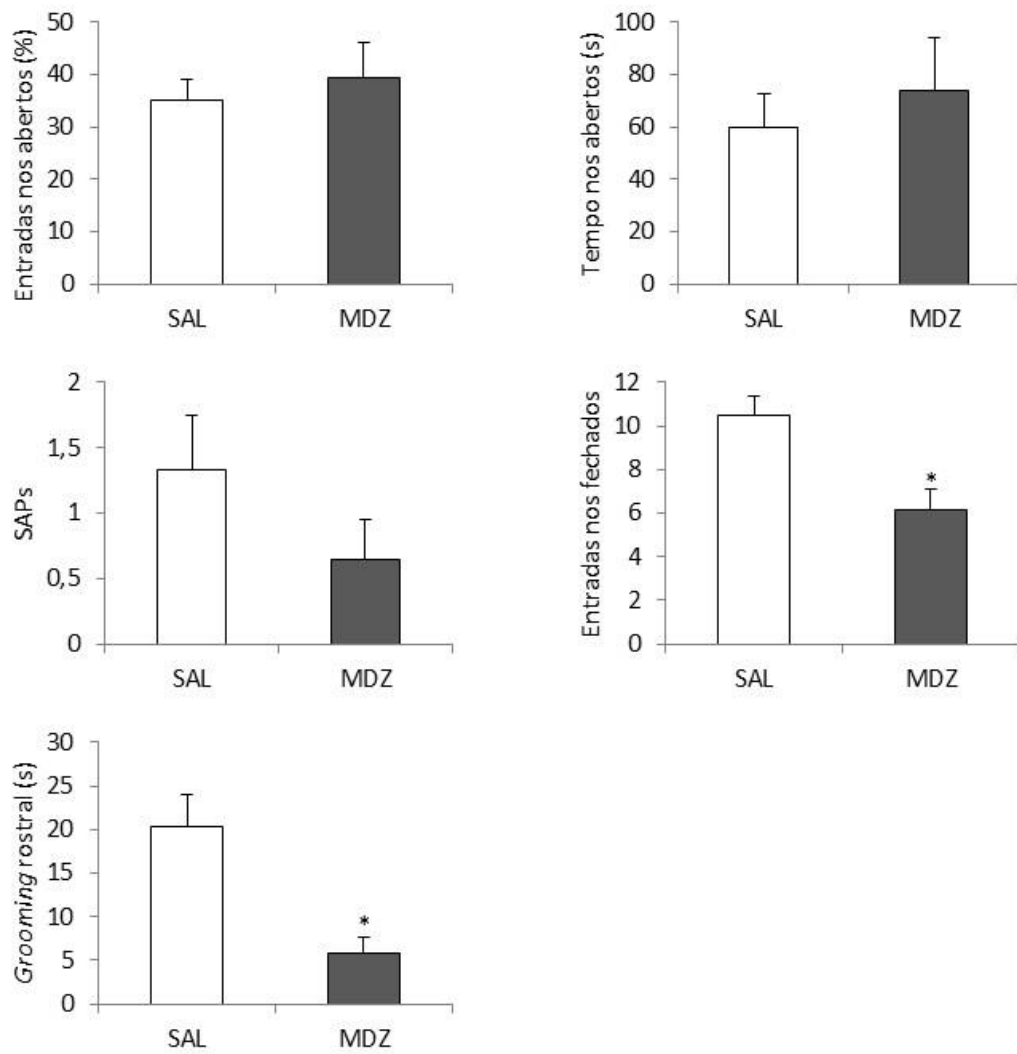


Figura 1. Medidas comportamentais (média \pm erro padrão da média) dos primeiros 5 min no LCE de ratos tratados com salina (SAL) ou midazolam (MDZ). *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL (teste t)

A Figura 2 mostra os efeitos do pentilenotetrazol nos primeiros 5 min da primeira sessão. De acordo com o teste t , houve efeito significativo da droga sobre o *grooming* rostral ($t_{[22]} = 2,640$; $p < 0,05$). Nas demais medidas, não houve efeito significativo. Não foi observado qualquer episódio de *grooming* corporal nesse período.

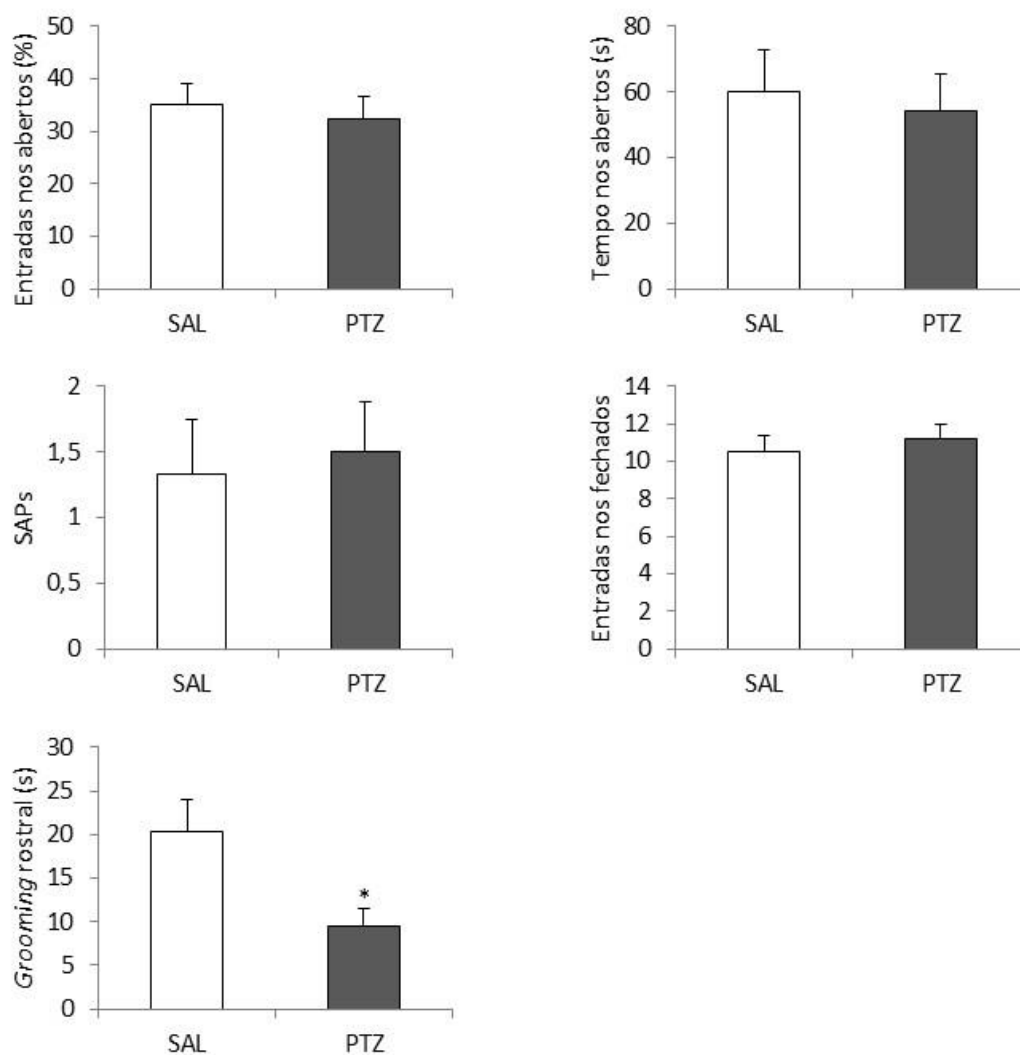


Figura 2. Medidas comportamentais (média ± erro padrão da média) dos primeiros 5 min no LCE de ratos tratados com salina (SAL) ou Pentilenotetrazol (PTZ). *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL (teste t).

Os resultados de porcentagem de entradas nos braços abertos das sessões de 20 minutos para os animais tratados com midazolam ou salina são apresentados na Figura 3. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,24]} = 0,73$; $p > 0,05$). Também não foi encontrado efeito significativo de sessão ($F_{[2,48]} = 2,22$; $p = 0,12$) nem de interação entre esses fatores ($F_{[2,48]} = 0,56$; $p > 0,05$).

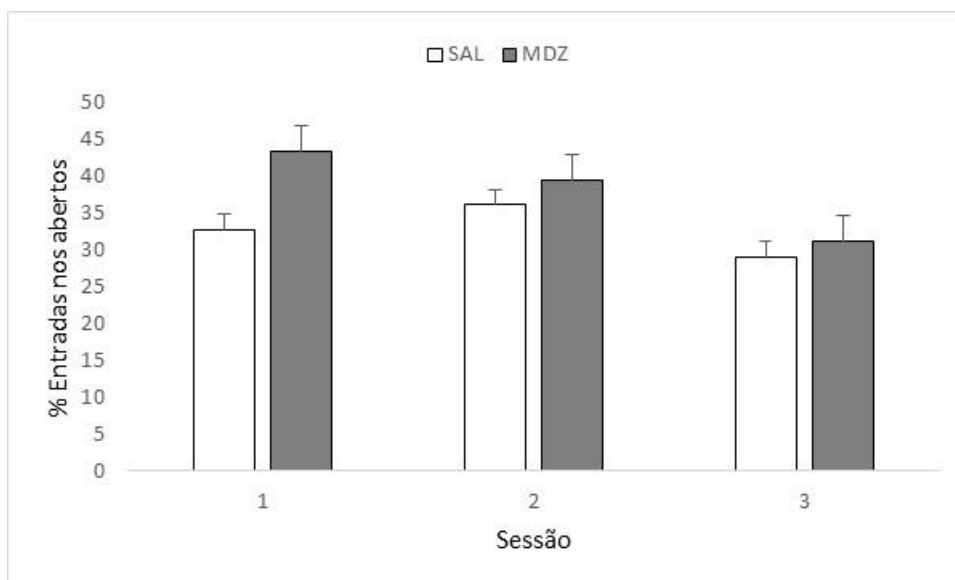


Figura 3. Média \pm erro padrão de medida porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE.

A Figura 4 apresenta os resultados de tempo nos braços abertos. O grupo tratado com Midazolam não foi significativamente diferente do grupo salina em nenhuma das sessões (Mann-Whitney: $p > 0,05$). Também não foi encontrado nenhum efeito de sessão, seja no grupo salina ($p > 0,05$) ou no Midazolam ($p > 0,05$).

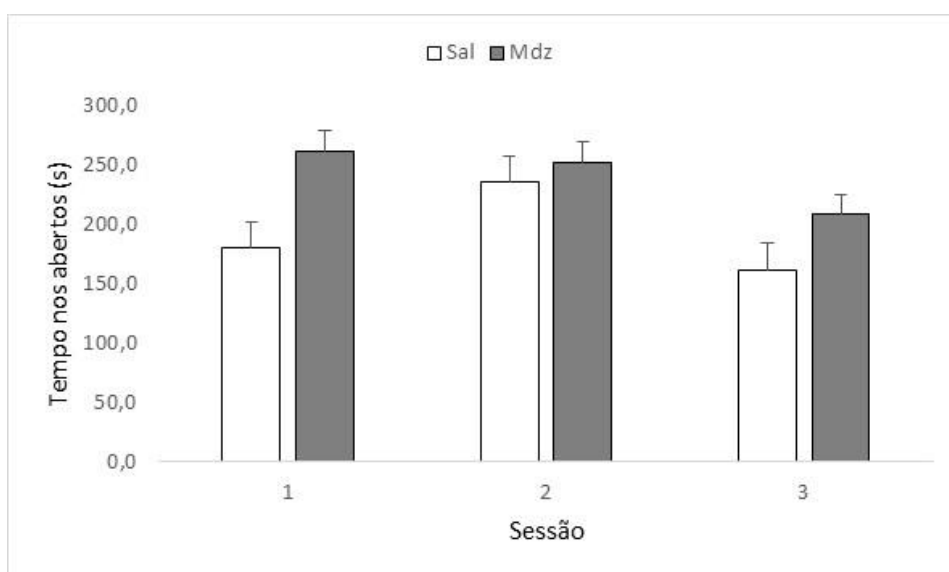


Figura 4. Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido nos braços abertos do LCE

Os resultados referentes à medida de SAP são apresentados na figura 5. O grupo tratado com Midazolam não foi significativamente diferente do grupo salina em nenhuma das sessões (Mann-Whitney: $p > 0,05$). O efeito de sessão também não foi verificado, seja no grupo salina ($p > 0,05$) ou no Midazolam ($p > 0,05$).

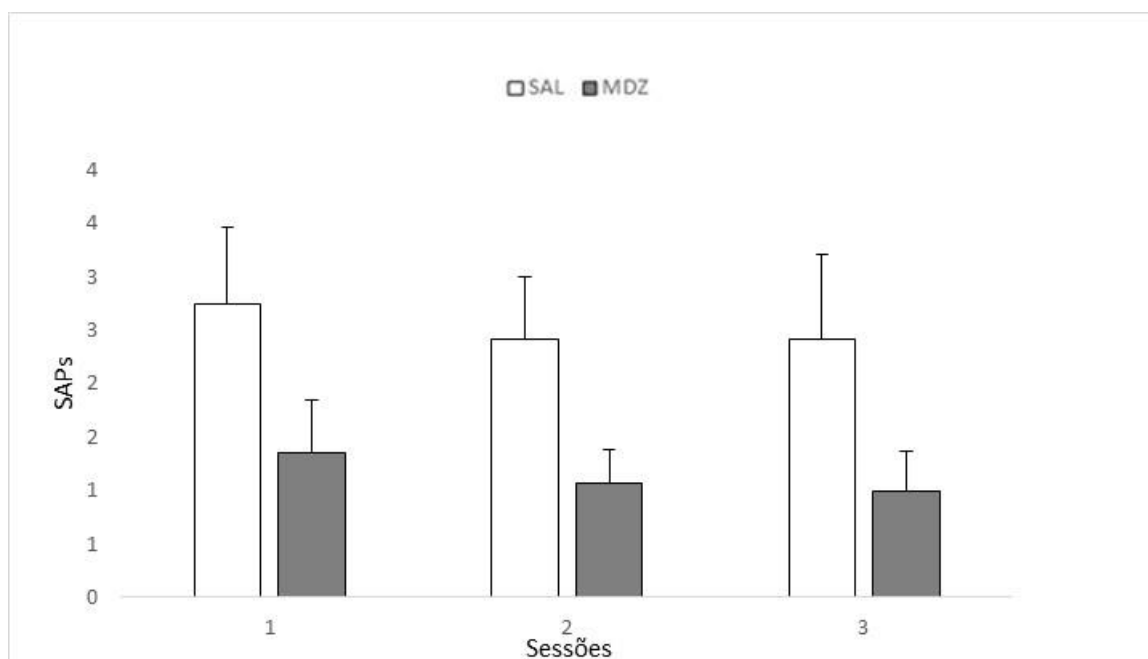


Figura 5. Média \pm erro padrão de medida de SAP no LCE

Os resultados de entradas nos braços fechados são apresentados na Figura 6. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,24]} = 8,36$; $p < 0,05$). Não foi encontrado efeito significativo de sessão ($F_{[2,48]} = 2,90$; $p = 0,06$) nem interação entre esses fatores ($F_{[2,48]} = 0,59$; $p > 0,05$). Com efeito, nas três sessões, de forma geral, os animais tratados com Midazolam apresentaram menor número de entradas nos fechados que o grupo Salina.

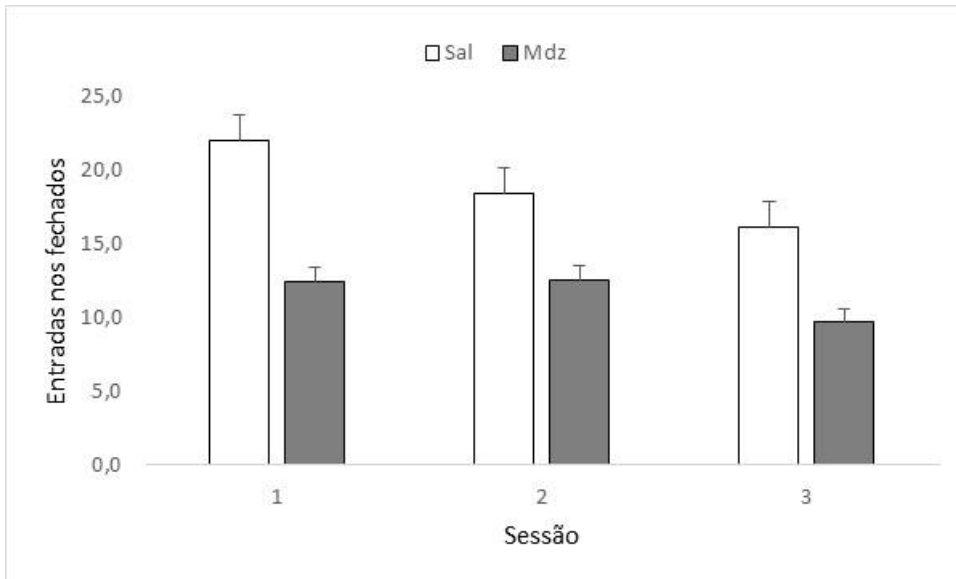


Figura 6. Média \pm erro padrão do número de entradas nos braços fechados do LCE

Os resultados do tempo de *grooming* rostral são apresentados na Figura 7. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,24]} = 18,41$; $p < 0,05$). Não foi encontrado efeito significativo de sessão ($F_{[2,48]} = 0,75$; $p = 0,47$) nem interação entre esses fatores ($F_{[2,48]} = 0,33$; $p > 0,05$). De fato, nas três sessões, os animais tratados com Midazolam apresentaram menor tempo de *grooming* rostral em relação ao grupo Salina.

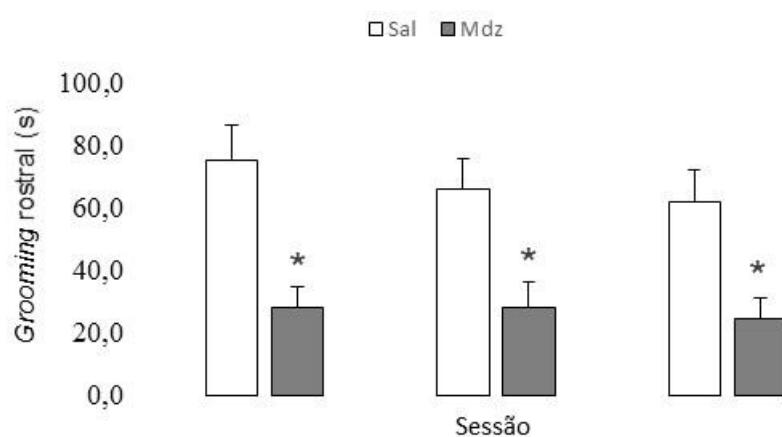


Figura 7. Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de *grooming* em seu componente rostral. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em cada sessão

A Figura 8 apresenta os resultados da medida de *grooming* corporal. O grupo tratado com Midazolam foi significativamente diferente do grupo salina em todas as sessões (Mann-Whitney: $p < 0,05$). Também foi encontrado efeito de sessão para o grupo Salina (Friedman: $p < 0,05$) entre as sessões 1 e 3 (Dunn's Multiple Comparison: $p < 0,05$). Dessa forma, no grupo tratado com Midazolam se observou um menor tempo de *grooming* corporal em todas as 3 sessões. Além disso, o grupo Salina apresentou um escore mais alto deste comportamento na sessão 3 em comparação com a primeira sessão.

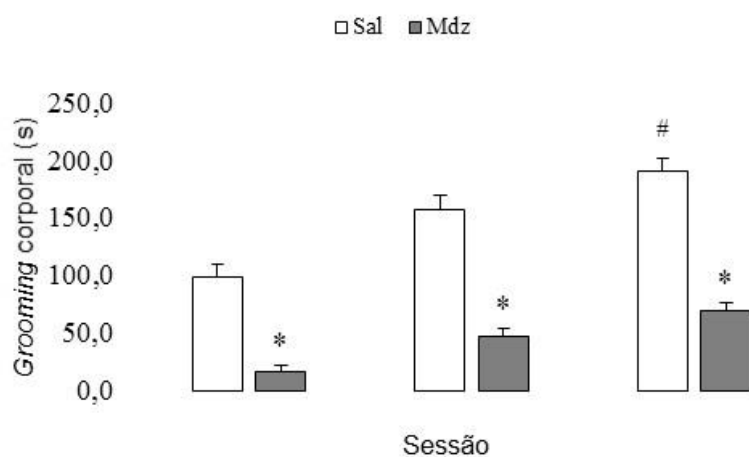


Figura 8. Média \pm erro padrão do tempo despedindo no comportamento de *grooming* em seu componente corporal. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em cada sessão (Mann-Whitney: $p < 0,05$). (#) Diferença entre as sessões 1 e 3 do mesmo tratamento (SAL) (Dunn: $p < 0,05$)

Na figura 9 constam os resultados da medida de *grooming* total. O grupo tratado com Midazolam foi significativamente diferente do grupo salina em todas as sessões (Mann-Whitney: $p < 0,05$). Não foi encontrado efeito de sessão para nenhum grupo (Dunn's Multiple Comparison: $p > 0,05$). Com efeito, no grupo tratado com Midazolam foi encontrado um menor tempo deste parâmetro em todas as sessões.

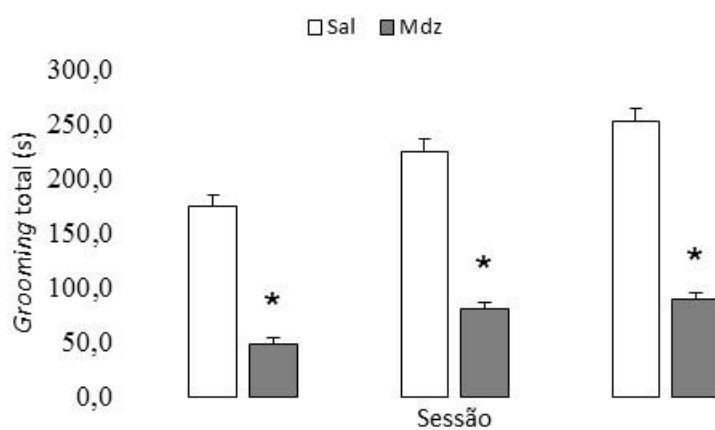


Figura 9. Média \pm erro padrão do tempo despendido nas diferentes formas do comportamento de *grooming*. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos MDZ e SAL em todas as sessões

A Figura 10 apresenta os resultados da porcentagem de entradas nos braços abertos para os animais tratados com pentilenotetrazol ou salina. A ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,22]} = 0,67$; $p > 0,05$), nem de sessão ($F_{[2,44]} = 0,16$; $p = 0,85$), ou de interação entre esses fatores ($F_{[2,44]} = 1,79$; $p > 0,05$).

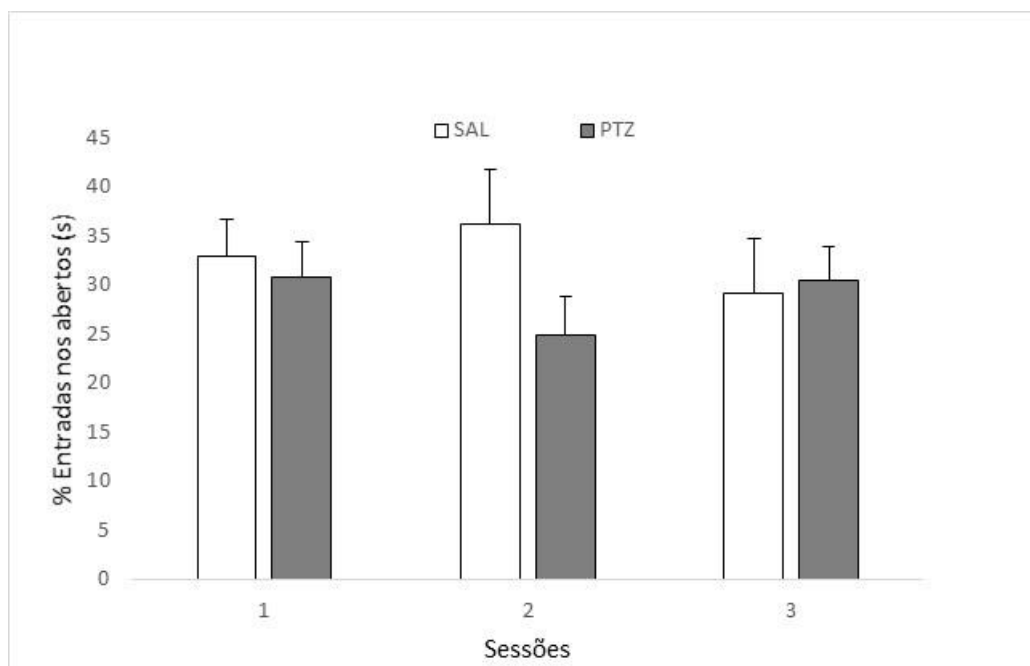


Figura 10. Média \pm erro padrão de medida de porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE.

A Figura 11 apresenta os resultados do tempo despendido nos braços abertos. O grupo tratado com Pentilenotetrazol não foi significativamente diferente do grupo salina em nenhuma das sessões (Mann-Whitney: $p > 0,05$). Também não foi encontrado nenhum efeito de sessão, seja no grupo Salina ($p > 0,05$) ou no Pentilenotetrazol ($p > 0,05$).

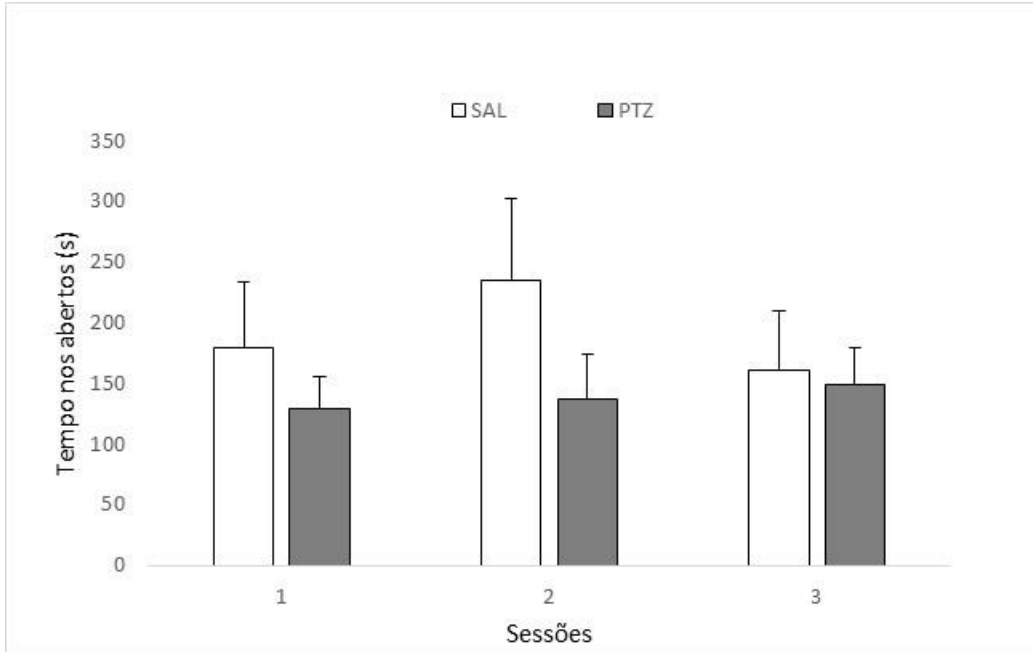


Figura 11. Média \pm erro padrão de tempo despendido nos braços abertos do LCE

Os resultados da medida de SAP são apresentados na figura 12. A ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,22]} = 0,33$; $p > 0,05$), nem de sessão ($F_{[2,44]} = 0,13$; $p = 0,88$), ou de interação entre esses fatores ($F_{[2,44]} = 0,19$; $p > 0,05$).

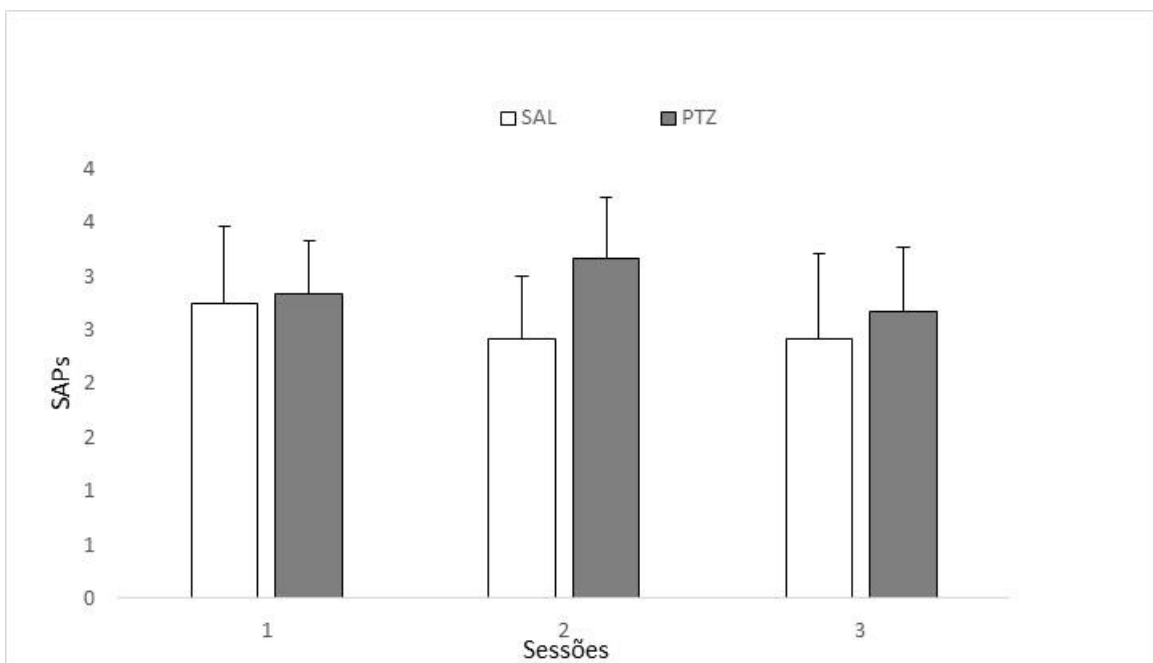


Figura 12. Média \pm erro padrão de medida de SAP no LCE

Os resultados de entradas nos braços fechados são apresentados na Figura 13. De acordo com a ANOVA de duas vias para medidas repetidas, não houve efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,22]} = 0,84$; $p > 0,05$), mas foi encontrado efeito significativo de sessão ($F_{[2,44]} = 7,47$; $p < 0,05$). A ANOVA também indicou que não ocorreu interação entre esses fatores ($F_{[2,48]} = 0,59$; $p > 0,05$). Coerentemente com o efeito de sessão, de acordo com o teste de Duncan, os grupos Salina e Pentilenotetrazol emitiram maior número de entradas nestes espaços na primeira sessão em relação à terceira.

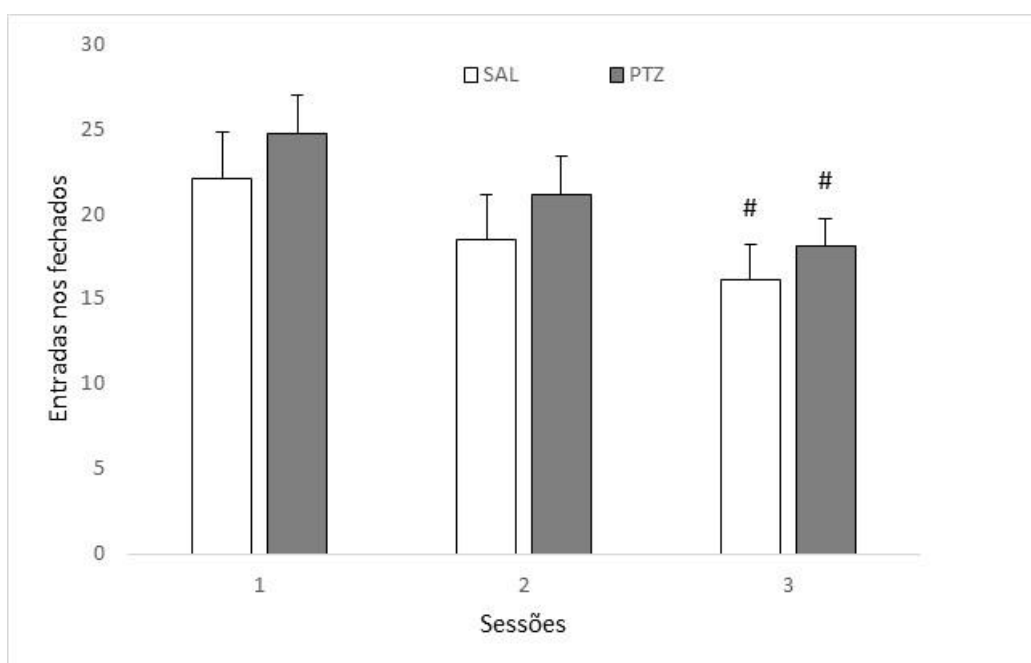


Figura 13. Média \pm erro padrão de medida do número de entradas nos braços fechados do LCE

A Figura 14 apresenta os resultados da medida de *grooming* rostral. De acordo com a ANOVA de duas vias para medidas repetidas, não houve efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,22]} = 3,07$; $p > 0,05$), mas foi encontrado efeito significativo de sessão ($F_{[2,44]} = 3,31$; $p < 0,05$). Todavia, indicou que não ocorreu interação entre esses fatores ($F_{[2,44]} = 0,10$; $p > 0,05$). Coerentemente com o efeito de sessão, de acordo com o teste de Duncan, o grupo

Pentilenotetrazol emitiu maior tempo de *grooming* rostral na primeira sessão em relação à terceira.

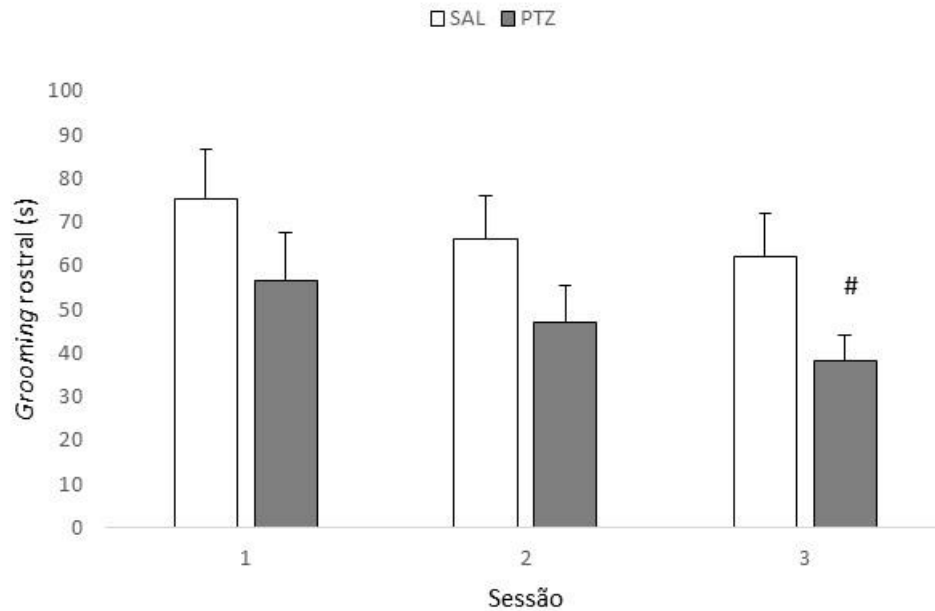


Figura 14. Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento *grooming* em seu componente rostral. (#) $p < 0,05$

A Figura 15 apresenta os resultados da medida de *grooming* corporal. O grupo tratado com Pentilenotetrazol foi significativamente diferente do grupo Salina em todas as sessões (Mann-Whitney: $p < 0,05$). Foi ainda encontrado efeito de sessão para o grupo Salina (Friedman: $p < 0,05$) entre as sessões 1 e 3 (Dunn's Multiple Comparison: $p < 0,05$), e para o grupo Pentilenotetrazol (Friedman: $p < 0,05$), também entre as sessões 1 e 3 (Dunn's Multiple Comparison: $p < 0,05$). Com efeito, no grupo tratado com Pentilenotetrazol se observou um menor tempo de *grooming* corporal em todas as 3 sessões. Além disso, os grupos Salina e Pentilenotetrazol apresentaram um escore mais alto deste comportamento na sessão 3 em comparação com a primeira sessão de mesmo tratamento.

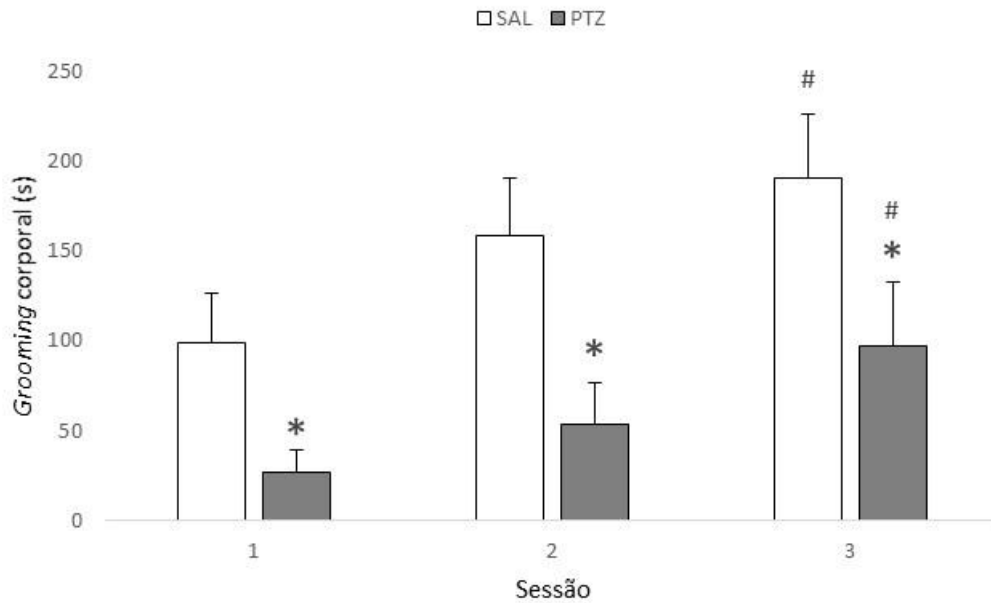


Figura 15. Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de *grooming* em seu componente corporal. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os grupos PTZ e SAL em cada sessão. (#) Diferença entre as sessões 1 e 3 do mesmo tratamento (SAL e PTZ)

A Figura 16 apresenta os resultados da medida de *grooming* total. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas, demonstrou efeito significativo do fator tratamento ($F_{[1,22]} = 5,69$; $p < 0,05$), e ainda, efeito significativo de sessão ($F_{[2,44]} = 6,18$; $p < 0,05$). No entanto, não apontou interação entre esses fatores ($F_{[2,44]} = 0,45$; $p > 0,05$). Coerentemente com o efeito de sessão, de acordo com o teste de Duncan, o grupo Pentilenotetrazol emitiu maior tempo de *grooming* total na terceira sessão em relação à primeira.

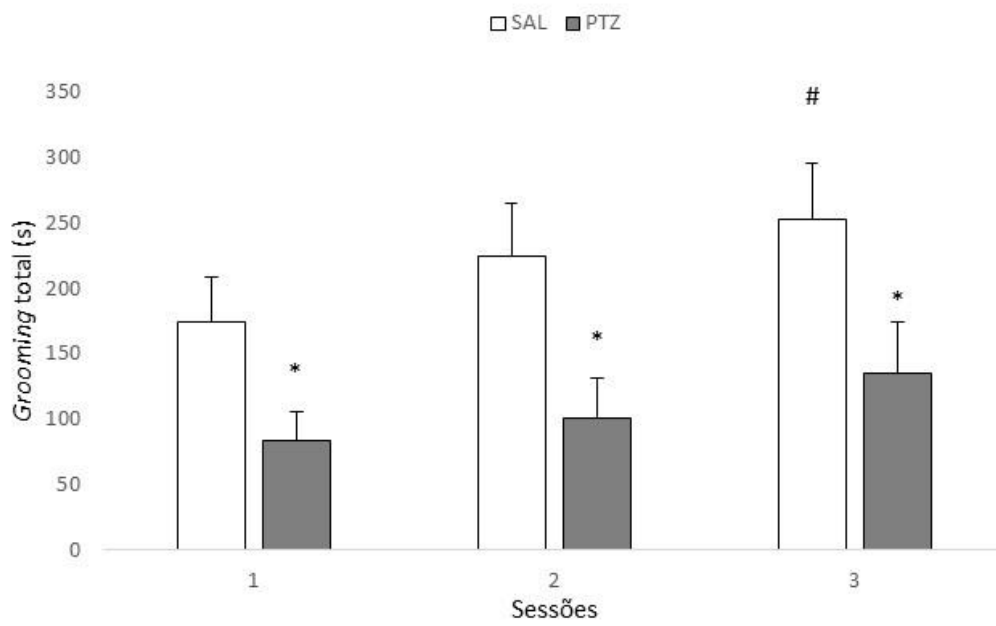


Figura 16. Média \pm erro padrão de medida do tempo despendido no comportamento de *grooming* em seus componentes rostral e corporal

DISCUSSÃO

Os objetivos do presente estudo foram verificar se o efeito do midazolam e do pentilenotetrazol se alteram em sessões repetidas e prolongadas no LCE; se as medidas do comportamento de *grooming* seriam sensíveis aos efeitos do fenômeno de OTT; e, neste sentido, se poderiam ser medidas úteis para a avaliação da ansiedade em ratos. Para este fim, os animais foram testados em 3 sessões de 20 minutos separadas por intervalos de 24 horas.

Nos 5 minutos iniciais da primeira sessão, que corresponde ao tempo de uma sessão convencional de testes realizados no LCE, foram avaliados 5 diferentes parâmetros comportamentais, comparando os escores apresentados pelo grupo controle, que recebeu salina, com os dois grupos experimentais que foram tratados com as drogas midazolam e pentilenotetrazol. Ao considerar a porcentagem de entradas e tempo despendido nos braços abertos, trazidas pela literatura como medidas tradicionais de ansiedade no modelo do LCE (Pellow & File, 1986; Gonzalez & File, 1997; Carobrez & Bertoglio, 2005), não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Estes valores são correspondentes aos apresentados pela medida de SAP, por sua vez, um outro importante indicador de ansiedade (Rodgers, Haller, Holmes, Halasz, Walton & Brain, 1999).

As diferenças estatisticamente evidenciadas pelo efeito de droga nos primeiros 5 minutos foram encontradas em dois parâmetros. Sobre as entradas nos braços fechados, uma medida útil para a verificação da atividade locomotora (Cruz, Frei, & Graeff 1994), os escores do grupo tratado com o midazolam foram significativamente inferiores aos do grupo controle, sugerindo uma pista sobre um possível efeito sedativo nestes animais. Quanto ao componente rostral do *grooming*, descrito em alguns estudos como um parâmetro cuja variação quantitativa pode servir como índice de estresse ou ansiedade (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005; Komorowska & Pisula, 2003), foi a única forma de *grooming* apresentada nos primeiros 5 minutos de teste, sendo observada uma diminuição dos escores dos dois

grupos experimentais em relação ao controle. Dessa forma, ainda que não estejam em plena consonância com as medidas tradicionais do LCE, estes dados suportam o *grooming* rostral como uma medida possivelmente útil para a avaliação da ansiedade, por demonstrar clara sensibilidade ao tratamento. Por outro lado, é importante contemplar a hipótese de que a redução visualizada no componente rostral do *grooming* seja produto de um possível efeito sedativo do midazolam, tendo em vista uma comparação com os valores de diferença significativa apresentados pela medida de atividade locomotora.

Observando os escores obtidos nas medidas de porcentagem de entradas e tempo despendido nos braços abertos nas sessões de 20 minutos no LCE, os resultados apontaram para uma ausência de um efeito ansiolítico e ansiogênico promovido por drogas. Sendo assim, a partir destas medidas não pôde ser abordada a ocorrência da OTT, um fenômeno comum em estudos que adotam sessões repetidas com este modelo (Griebel et al., 1993; Bertoglio & Carobrez, 2004).

Nesta linha, vale frisar que, semelhante ao que foi encontrado nos primeiros 5 minutos da primeira sessão, as medidas de porcentagem de entradas, tempo despendido nos braços abertos e SAP, não apresentaram diferença estatisticamente significativa com a administração das drogas ansiolítica e ansiogênica. Já sobre as entradas nos braços fechados, os resultados trouxeram que os escores obtidos nas 3 sessões do grupo tratado com o midazolam foram inferiores aos do grupo controle, sugerindo que a hipótese de prejuízo locomotor levantada na análise dos 5 primeiros minutos poderia ser considerada também nas sessões repetidas de 20 minutos.

Com relação ao efeito das drogas sobre o *grooming* rostral, foram encontradas diferenças em relação às medidas tradicionais, sendo que o midazolam produziu uma diminuição no *grooming* rostral em todas as sessões ao se comparar seus escores com os apresentados pelo grupo controle. Partindo de um arranjo semelhante, em um outro estudo

realizado no nosso laboratório, Munchen (2013) verificou uma diminuição do tempo deste parâmetro a partir da administração de outro benzodiazepínico. Estes achados reforçam que a medida de *grooming* rostral pode ser útil para a avaliação da ansiedade em ratos expostos ao LCE, sendo notória sua variação por meio da administração de uma droga ansiolítica. No entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as 3 sessões, e seus escores permaneceram estáveis, apresentando um indício de que o *grooming* rostral não se mostrou sensível ao fenômeno da OTT.

De maneira distinta ao rostral, visivelmente estável ao longo das 3 sessões, o *grooming* corporal não ocorreu nos primeiros 5 minutos da primeira sessão, e nas sessões repetidas de 20 minutos, foi observado que os efeitos das duas drogas foram na mesma direção. Assim, os animais tratados com o midazolam, apresentaram uma redução no tempo despendido no *grooming* corporal em relação ao grupo controle em todas as sessões. Escores aproximados foram observados no grupo tratado com o pentilenotetrazol, que nas 3 sessões também apresentou uma redução significativa do componente corporal do *grooming*.

Sobre a semelhança apresentada nos escores dos dois grupos experimentais, Fernández-Teruel & Estanislau (2016) apontam que a frequência do comportamento de *grooming* pode ser alterada em relação ao grau ansiogênico do contexto e atividade nos quais os animais estão expostos. Neste sentido, a emissão deste comportamento seria reduzida à medida em que os animais estejam inseridos em situações não ameaçadoras, por exemplo, quando estão comendo, ou em outras com elevado grau de ameaça, como quando são expostos à choques elétricos. Neste último caso, seria mais comum a emissão do *freezing* (congelamento), por sua vez, tido como um parâmetro comportamental bastante característico em roedores expostos a condições ameaçadoras, mas que não foi avaliado em nossa pesquisa. De acordo com esta leitura, o comportamento de *grooming* seria mais comum em situações de redução da excitação (*dearousal*), e afastadas dos extremos de nenhuma ameaça ou ameaça

excessiva. Sob esta teoria, é possível interpretar que nosso arranjo experimental, integrando a administração do midazolam e do pentilenotetrazol, produziu um efeito que caracteriza, em algum grau, condições de ansiólise e ansiogênese, respectivamente.

É interessante destacar que houve um aumento progressivo do aparecimento do *grooming* corporal para todos os grupos, sendo visualizada uma diferença estatisticamente significativa entre a primeira e terceira sessão para os grupos salina e tratado com o pentilenotetrazol. Este achado permite ser observado como um indicativo de habituação, já que o aumento de sua frequência pode estar associado às condições de redução da excitação *dearousal* (Fernández-Teruel & Estanislau, 2016). Com efeito, Veloso, Filgueiras, Lorenzo & Estanislau (2016) verificaram numa sessão de testes com duração de 30 minutos no LCE com ratos, um aumento significativo deste parâmetro ao comparar os escores dos primeiros 5 minutos com o restante da sessão, que concentraram uma maior frequência deste comportamento, reforçando nossa interpretação.

Ao abordar os resultados de *grooming* total, que equivale à soma dos escores apresentados pelos componentes rostral e corporal, se encontra que o midazolam produziu uma redução no tempo deste parâmetro. Entretanto, fica evidente que a variação verificada nos grupos controle e experimental sofreu uma clara influência dos números correspondentes ao *grooming* corporal. Essa mesma constatação se aplica ao comparar os números do grupo tratado com pentilenotetrazol, destacando que o *grooming* corporal se mostrou um parâmetro sensível ao efeito ansiogênico da droga.

Considerando as medidas de *grooming*, pode-se dizer que elas não se mostraram em consonância com as medidas de ansiedade tradicionalmente avaliadas no modelo do LCE. Sendo assim, vale enfatizar que, embora as medidas de porcentagem de entradas, tempo gasto nos braços abertos e SAP, não tenham demonstrado uma sensibilidade expressiva ao tratamento de droga, o midazolam produziu uma significativa redução no *grooming* rostral em

todas as sessões. Dessa forma, é coerente pensar neste parâmetro como uma medida possivelmente útil para a avaliação da ansiedade em ratos, ainda que seus episódios também possam ser afetados pelo efeito sedativo do fármaco. Para tanto, é importante sugerir que outros testes que contemplem condições experimentais distintas, incluindo o fator dosagem de droga, sejam realizados a fim de acumular evidências sobre o seu papel enquanto um potencial marcador comportamental de ansiedade.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association (2014). *Diagnostic and statistical manual for mental disorders* (5th ed.). Washington, DC.
- Argyropoulos, S. V., Sandford, J. J., & Nutt D. J. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology & Therapeutics*, 88(3), 213-227.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyperdopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*, 3(1), 4.
- Berridge, K. C., Fentress, J. C., & Parr, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioural Brain Research*, 23(1), 59-68.
- Bertoglio, L. J., & Carobrez, A. P. (2004). Scopolamine given pre-trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze trial 2. *Behavioral Pharmacology*, 15(1), 45-54.
- Borsini, F., Podhorna, J., & Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*, 163(2), 121-141.
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). The elevated plus maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 29(8), 1193-1205.
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171-176.
- Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G.; Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neuroscience Research*, 77(4), 187-201.
- Estanislau, C., Ramos, A. C., Ferraresi, P. D., Costa, N. F., Carvalho, H. M. C. P., & Batistela, S. (2011). Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behavioural Processes*, 86(1), 46-51.
- Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5(1), 105-112.
- Fernández-Teruel, A., & Estanislau, C. (2016). Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. *Nature Reviews Neuroscience*, 591-592.
- File, S. E., Mabbutt, P. S., & Hitchcott, P. K. (1990). Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordizepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*, 102(1), 98-101.
- Gonzalez, L. E., & File, S. E. (1997). A five-minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 17, 1505-1511.

- Gouveia, A., Jr., & Morato, S. (2002). Influências do ciclo estral no desempenho de ratos no labirinto em cruz elevado. *Interação em Psicologia*, 6(2), 141-148.
- Griebel, G., Moreau, J-L., Jenck, F., Martin, J. R., & Misslin, R. (1993). Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behavioural Processes*, 29, 37-48.
- Graeff, F. G., & Guimarães, F. S. (1999). *Fundamentos de psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu.
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327, 1-5.
- Imhof, J. T., Coelho, Z. M. I., Schmitt, M. L., Morato, G. S., & Carobrez, A. P. (1993). Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus-maze apparatus. *Behavioral Brain Research*, 56, 177-180.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: Potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143, 169-177.
- Kalueff, A. V., Wheaton, M., & Murphy, D. L. (2007). What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behavioural Brain Research*, 179(1), 1-18.
- Kametani, H. (1988). Analysis of age-related changes in stress-induced grooming in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 525, 101-113.
- 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. *Archives of General Psychiatry*, 62, 617-27.
- Komorowska, P., & Pisula, W. (2003). Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behavior in rats? *International Journal of Psychology*, 16, 237-246.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 48, 254-260.
- Matell, M. S., Berridge, K. C., & Aldridge, J. W. (2006). Dopamine D1 activation shortens the duration of phases in stereotyped grooming sequences. *Behavioural Processes*, 71(2-3), 241-49.
- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70(2), 83-244.
- Moyaho, A., & Valencia, J. (2002). Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 116(3), 263-269.

- Munchen, P. A. (2013). *Utilidade da auto-limpeza para avaliação da ansiedade em ratos repetidamente expostos a sessões prolongadas de labirinto em cruz elevado*. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525-529.
- Peregrino, A. (1997). Ansiedade normal e patológica. In L. A. B. Hetem, & F. G. Graeff (Eds.). *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. Rio de Janeiro: Científica Nacional.
- Pires, G. N., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2012). Relação entre privação de sono e ansiedade na pesquisa básica. *Einstein*, 10(4).
- Pereira, J. K. D., 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 Science*, 65(10), 101-107.
- Rodgers, R. J., & Cole, J. C. (1994). The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In S. J. Cooper, & C. A. Hendrie (Orgs.). *Ethology and psychopharmacology*. Nova York: Wiley.
- Rodgers R. J., Haller, J., Holmes, A., Halasz, J., Walton, T. J., & Brain, P. F. (1999). Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, 68(1-2), 47-53.
- Spruijt, B. M., van Hooff, J. A. R. A. M., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and Neurobiology of Grooming Behavior. *Physiological Reviews*, 72(3), 825-852.
- Veloso, A. W. N., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., & Estanislau, C. (2016). Modulation of grooming behavior in rats by diferente test situations. *Psychology & Neuroscience*, 9, 91-104.
- Zangrossi, H. (1997). Modelos Animais de Ansiedade In: Hetem, L. A. B.; Graeff, F. G. (Orgs.). *Ansiedade e Transtornos de Ansiedade*. Rio de Janeiro, RJ: Científica Nacional.