



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

IURY FLORINDO

***GROOMING* COMO MARCADOR NÃO-INVASIVO DE  
ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO EM RATOS**

IURY FLORINDO

***GROOMING* COMO MARCADOR NÃO-INVASIVO DE  
ESTRESSE AGUDO POR CONTENÇÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Análise do Comportamento – Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau.

Londrina  
2015

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

Florindo, Iury .

Grooming como marcador não-invasivo de estresse agudo por contenção em ratos / Iury Florindo. - Londrina, 2015.  
41 f. : il.

Orientador: Célio Roberto Estanislau.

Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Letras e Ciências Humanas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Análise do Comportamento - Teses. 2. Estresse - Teses. 3. Grooming - Teses. 4. Psicobiologia - Teses. I. Estanislau, Célio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Letras e Ciências Humanas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

IURY FLORINDO

***GROOMING* COMO MARCADOR NÃO-INVASIVO DE ESTRESSE  
AGUDO POR CONTENÇÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Análise do Comportamento – Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Amaury Gouveia Júnior  
Universidade Federal do Pará - UFPA

---

Profa. Dra. Camila Muchon de Mello  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2015.

*“À tout le monde  
À tous mes amis  
Je vous aime  
Je dois partir”*

Dave Mustaine

## Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha digníssima mãe por entender minhas ausências e me lembrar sempre do melhor; aprendi a ter forças com você.

Ao meu orientador Célio Roberto Estanislau pela paciência, didática e por se mostrar um orientador incrível, sempre disposto à ajudar.

Aos membros do laboratório: Guilherme Filgueiras, por ser um grande amigo à anos e exemplo de cientista; Rodrigo Klein que me ajudou nos procedimentos com os animais sempre de bom humor; Taimon Maio sempre com conversas interessantes e contribuições das mais variadas, da política *aocyberpunk*. Agradeço também ao Luciando, Mayron, Andressa e Thiago por entrarem nesta etapa de minha vida.

Ao meu amigo de longa data, da graduação ao mestrado, Dainon Machado, por todas as besteiras e acertos que já fizemos juntos. Admiro seu jeito de levar a vida e espero continuar participando dela até nos tornarmos velhos rabugentos.

Ao meu amigo Guilherme Ponce, meu co-piloto por anos. Te desejo sorte nessa nova etapa de sua vida. Você é grande! Saudades, meu amigo.

Aos meus companheiros de mestrado Vitor Araújo, Valquíria Gonçalves, Iza Perkoski, Dalila Carmo, Ariadne Suzuki e Yhan; alguns novos bons amigos e outras amizades renovadas. Foi incrível estar com vocês.

Ao professor Ari Bassi, que admiro desde o primeiro ano de graduação. Inifitas conversas com textos lidos pela metade que sempre renderam muitas risadas e vontade de aprender com você.

Agradeço à Bruna Aguiar por ser uma profissional tão dedicada e responsável. Você sempre acreditou em mim e me fez ver a vida de uma maneira tão simples; vou carregar o que você me ensinou por onde eu estiver.

Aos meus amigos doteiros: Daniel Galbes, Higor Strick, Jefferson Ambrósio, Stelio Sperandio, Guilherme Henrique, Djalma Leatti, Lily Franco, Fernando Arai, Rafu, Sbrogio, Vrimes, Marco Aurélio, Shiitake e Vinádio, com quem compartilho meus planos, minhas idéias, reclamações, conquistas e alguns momentos de Dota. *Selemene commands!*

À CAPES, pelo apoio financeiro.

FLORINDO, Iury. **Grooming como marcador não-invasivo de estresse agudo por contenção em ratos.** 41f. 2015. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O *grooming* de roedores é um comportamento de limpeza que pode frequentemente ser melhor explicado considerando o contexto em que ocorre, podendo ser exacerbado por eventos como estressores ambientais ou novidade. Mesmo havendo uma relação conhecida com o stress, muitos estudos negligenciam o *grooming* enquanto medida comportamental. Entretanto, pesquisas apontam que o *grooming* pode prover dados sobre a ansiedade e estresse. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivos investigar o efeito de diferentes durações de contenção de movimento e diferentes intervalos de tempo entre contenção e teste (em uma caixa de acrílico) no *grooming* de roedores. Foram utilizados 70 ratos da linhagem *Wistar*, submetidos à contenção de 15, 30 e 120 minutos. Os animais submetidos à contenção foram isolados individualmente em um aparato de rede de arame de formato cônico, moldado ao corpo do animal, de modo a restringir seus movimentos das patas e cabeça, impedindo que gire em torno de si. Após o intervalo (0 ou 20 min), foi realizado o teste em uma caixa de acrílico, em que o animal foi colocado no centro e permaneceu por 20 minutos. Não foi encontrada distribuição normal nos dados (teste de Shapiro-Wilk) por isso foram realizadas análises estatísticas não-paramétricas (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). Como resultado, imediatamente após um período de duas horas de contenção de movimentos, os ratos apresentaram aumento na atividade de *grooming* em relação ao grupo controle. Os resultados indicam relação entre o estresse causado pela contenção e o aumento na duração de *grooming*. O tempo mínimo de sessão para a ocorrência significativa de *grooming* é de 10 minutos. Já o tempo de contenção mínimo recomendado para ocorrência do comportamento de *grooming* é de duas horas.

**Palavras-chave:** *Grooming*. Estresse. Contenção. Ansiedade.

FLORINDO, Iury. **Grooming as a noninvasive marker of acute restraint stress in rats.** 41p. 2015. Dissertation (Master degree in Behavior Analysis) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

Rodent grooming is a cleaning behavior which is often best explained by the environmental context, may be exacerbated by events such as environmental stressors or novelty. Even though it's long known relationship with stress, grooming is frequently neglected in behavioral studies investigating stress, anxiety and fearfulness. However, some studies indicate that grooming can provide useful information about these issues. Accordingly, the present study aimed to investigate the effect of different movement restraint durations and different time intervals between restraint and testing (in an acrylic box) in rodent grooming. Wistar male rats (n = 70) were either restrained in a wire mesh for 15, 30 or 120 min. The animals subjected to restraint were individually isolated in an apparatus of cone-shaped wire mesh, molded the animal's body, in order to restrict their movements of the legs and head, preventing rotate around each other. After the interval (0 to 20 min), the test was carried out in an acrylic box where the animal was placed in the center and stood for 20 minutes. The duration of grooming behavior was recorded in respect to its regional distribution (rostrum or body). Stereotyped chains (a rostrocaudal sequence of movements) were also recorded. There was no normal distribution of data (Shapiro-Wilk test) by that it was performed non-parametric statistical analysis (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). As a result, immediately after a period of two hours of restraint movements, the rats showed increased grooming activity compared to the control group. Significant differences between the group and the control R120I0 in body grooming and often stereotypical chains were found. The results indicate the relationship between the stress of restraint and increased grooming duration. The minimum time for the session significant occurrence of grooming is 10 minutes. Already the minimum restraint time recommended for the occurrence of *grooming* behavior is two hours.

**Keywords:** *Grooming*. Stress. Restraint. Anxiety.

## **LISTA DE TABELA**

<i>Tabela 1 - Descrição do procedimento experimental</i> .....	19
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Duração total do grooming em 5, 10 e 20 minutos. (mediana, mediana, variação interquartil, max-min).....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 2 - Duração do grooming rostral em 5, 10 e 20 minutos. (mediana, variação interquartil, max-min).....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3 - Duração do grooming corporal em 5, 10 e 20 minutos. (mediana, variação interquartil, max-min). Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4 - Frequência de cadeias estereotipadas em 5, 10 e 20 minutos. (mediana, variação interquartil, max-min). Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 5 - Frequência de locomoção em 5, 10 e 20 minutos. (mediana, variação interquartil, max-min). Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste. O teste de Kruskal Wallis não indicou diferenças significantes entre os grupos.....</i>	<i>29</i>

## SUMÁRIO

Introdução.....	10
Estresse e <i>Grooming</i> .....	12
Material e Método .....	18
Sujeitos .....	18
Protocolo de Estress .....	18
Análise de Dados .....	20
Resultados.....	20
Total de <i>Grooming</i> .....	21
<i>Grooming</i> Rostral .....	23
<i>Grooming</i> Corporal .....	25
Cadeias Estereotipadas .....	27
Locomoção .....	29
Discussão .....	30
Considerações Finais .....	36
Referências .....	37

## Introdução

O objetivo dos modelos animais comportamentais é promover a compreensão da condição modelada e elucidar seus mecanismos de ação (Geyer & Markou, 1995). De acordo com Fernandez, Mello Cruz e Brandão (2006) é possível correlacionar transtornos de ansiedade com respostas apresentadas por animais frente à situações estressoras ou de perigo. Nesse sentido, modelos animais comportamentais são criados com o objetivo de simular situações permitindo a investigação dos aspectos etiológicos e formas de tratamento relacionados à transtornos de ansiedade.

Modelos animais de ansiedade que utilizam diversos comportamentos de defesa que investigam comportamentos que não precisam ser aprendidos, são preferência de grande parte da comunidade científica, na medida em que não envolvem situações de treino, apresentam baixo custo e têm sessões de curta duração. O *grooming* de roedores, apesar de negligenciado pela maioria da comunidade científica, se enquadra nesta categoria de comportamento e vem sendo investigado por alguns pesquisadores (Veloza 2012; Estanislau 2012; Capechi 2002; Kalueff e Touhimma 2005; Kalueff e Touhimaa 2005b; Berridge 1990; Van Hoof e Gipsen 1992) como um possível marcador de ansiedade.

De acordo com Greer e Capechi (2002) o *grooming* é um comportamento inato encontrado na maior parte das espécies, incluindo humanos, descrito como um padrão-fixo de ação com função primária de higiene e cuidados da pele. Entretanto este é um comportamento que pode ser melhor explicado descrevendo o contexto em que ocorre (Spruijt, Van Hoof e Gipsen 1992).

De acordo com Berridge, Aldridge, Houchard e Zhuang (2005) os movimentos de *grooming* são ordenados sequencialmente e incluem cadeias sintáticas, que envolvem cerca de 25 movimentos diferentes, divididos em 4 fases. A fase I consiste numa série de 5 à 10

movimentos elípticos de fricção das patas no focinho e nas vibrissas e dura por volta de 1 segundo. A fase II é de curta duração (cerca de 0.25 segundos) e consiste de 1 à 4 movimentos de patas unilaterais. A fase III consiste de 1 à 5 movimentos com ambas as patas dianteiras na região das orelhas. Segundo os autores, é a fase com os movimentos mais estereotipados e dura de 1 à 4 segundos. A fase 4 é composta por movimentos prolongados de lambidas de regiões ventrais e laterais do tronco.

De acordo com Berridge (1990) há uma tendência em roedores de seguir a cadeia comportamental sintática; nesse sentido, para o roedor apresentar a fase 4, existe grande probabilidade de desempenhar as fases anteriores. Quando o roedor apresenta a cadeia sintática de maneira rígida e completa é chamada de super estereotipia sequencial.

Muitos estudos negligenciam o *grooming* enquanto medida comportamental, contudo os estudos de Kalueff e Touhima 2005; Estanislau 2012; Komorowska e Pisula 2003; Berridge et al. 2005 sugerem que o *grooming* pode prover dados sobre a ansiedade e estresse. Estanislau, Ramos, Ferraresi, Costa, de Carvalho & Batistella (2011) em um estudo que avaliou ansiedade correlacionando o labirinto em cruz elevado seguido de nado forçado mostraram que os animais que apresentaram menor tempo nos braços abertos, ou seja, considerados com maior nível de ansiedade foram os mesmos animais que apresentaram maior duração no comportamento de *grooming*.

O *grooming* foi sugerido como uma resposta de enfrentamento (*coping*) frente à estímulos estressores (Spruijt, van Hoof, & Gispen, 1992). Komorowska e Pisula (2003) apontam que o componente corporal do *grooming* seria uma medida mais sensível da resposta de enfrentamento a eventos estressores e um indicativo de acomodação aos estressores ambientais (*dearousal*), em oposição ao componente rostral do *grooming*, que se mostra pouco sensíveis a tais eventos. De acordo com Gispen e Isaacson (1981)

*ogrooming* pode ser induzido pela administração de hormônio adrenocorticotrófico. Contudo, Bressers, et al., (1995) apontam que o *grooming* induzido de formas farmacológicas pode apresentar mudanças na ordem da cadeia sintática, bem como diferentes topografias do comportamento.

Em um estudo, Estanislau, Díaz-Morán, Cañete, Blázquez, Tobeña, e Fernández-Teruel (2013) fizeram uma série de apontamentos em relação aos contextos em que o *grooming* pode ocorrer: a) o *grooming* é suprimido quando o evento aversivo está em curso; b) o *grooming* corporal tende à aumentar em ambientes novos; c) *grooming* rostral tem maior chance de ocorrer quando o evento aversivo tem a possibilidade de ocorrer. Segundo Marroni (2005) existem três principais contextos em que o *grooming* pode ocorrer. O primeiro deles é a resposta à contaminação, como o contato dos ratos com fezes. O segundo é uma resposta em contexto em que há conflito comportamental; o terceiro contexto e mais relevante para o presente estudo é o *grooming* como resposta à exposição de eventos estressores.

### **Estresse e *Grooming***

De acordo com Graeff (2007) a definição de estresse é baseada na observação de que diferentes tipos de condições físicas ou psicológicas que ameaçam a homeostase do organismo eliciam o mesmo conjunto de alterações corporais. Esta definição é baseada no conceito de síndrome de adaptação geral, desenvolvida por Hans Selye (1936). Segundo Zuardi (2014) o estresse pode ser definido como um estado antecipado ou real de ameaça ao equilíbrio do organismo (homeostase); o organismo então, tenta restabelecer o equilíbrio através de um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais. Do ponto de vista comportamental, as respostas básicas à um estressor são enfrentamento, evitação ou passividade; os modelos animais então, podem utilizar procedimentos para investigar os

diferentes efeitos de contextos estressores nestas respostas básicas (Margis, Picon, Cosner e Silveira 2003).

É possível avaliar o estresse através respostas hormonais ou imunológicas. Para Ghaidi (2010) as respostas ao estresse são mediadas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O SNA é o responsável pela resposta imediata à exposição ao estressor, provocando alterações nos estados fisiológicos através da inervação dos órgãos; é possível que o organismo tenha a frequência cardíaca aumentada, por exemplo, através da liberação de noradrenalina nas terminações dos versos simpáticos e adrenalina, pela estimulação simpática das células da medula da glândula adrenal. Os glicocorticóides como o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, são liberados pelo HPA e participam do controle da homeostase e da resposta do organismo ao estresse.

De acordo com Rivera (2002) várias condições podem causar estresse no animal, como novidade, estímulos indutores de medo, situações de conflito e incapacidade de realizar determinados padrões de comportamento. Segundo Borges, Gonçalves-Luiz e Domingos (2009) o estresse pode ser descrito como uma reação psicofisiológica que tem sua origem na resposta de confronto do organismo com estímulos que ameacem sua homeostase, ou seja, um evento acompanhado de mudanças bioquímicas e comportamentais relacionadas tanto à alteração de um acontecimento estressante, quanto à acomodação dos seus efeitos. Nesse sentido, qualquer situação que possa gerar um estado emocional forte, levando a uma quebra da homeostase exigindo algum tipo de adaptação, é considerada um estressor.

De acordo com Radley, Kabbaj, Jacobson, Heydendael Yehuda e Herman (2013) a adaptação frente ao estresse físico ou psicológico é uma grande prioridade para todos os

sistemas biológicos. Nesse sentido, a seleção natural favoreceu um conjunto eficiente de sistemas que mantêm a integridade fisiológica, mesmo nas mais exigentes condições de bloqueio. A estratégia adaptativa recruta sistemas que atuam como efetores rápidos e atrasados, e estratégias para limitar ou evitar a exposição ao estressor. A maioria das respostas ao estresse envolve a utilização de recursos para se adaptar às condições adversas. Geralmente, os padrões de resposta tendem a se adequar à ameaça predominante; por exemplo, as respostas ao estresse agudo geralmente declinam logo após o estressor ser retirado.

Segundo Franci (2005) os estressores podem ser divididos em agudos (únicos, intermitentes porém curtos e exposição em tempo limitado) ou crônicos (duração prolongada, intermitente e prologada ou exposição contínua). Segundo Blanchard e Blanchard (1986) diferentes níveis de ansiedade levam à diferentes padrões de respostas defensivas. Se o contexto for uma novidade (como a exposição em um novo ambiente) o animal irá apresentar mais comportamentos relacionados com avaliação de risco, como o rearing (erguer-se apoiado pelas patas traseiras) e aumento na locomoção.

Uma maneira de avaliação do estresse é através de medidas de comportamento, como marcadores não-invasivos. Uma vantagem desta alternativa é a rapidez e baixo custo de procedimento e possibilidade de estabelecer analogias com os transtornos. De acordo com Rivera (2002) vários são os marcadores não-invasivos de estresse em roedores, como alterações no consumo de alimentos, agressividade, vocalização, defecação e postura. Na medida em que o *grooming* é um comportamento que não precisa ser aprendido é facilmente detectável, sua escolha enquanto marcador de ansiedade e estresse pode contribuir para um modelo animal eficaz.

Spruijt, Van Hoof & Gispen, (1992) apontam que o *grooming* pode ser modulado por diferentes contextos. Um destes contextos é a exposição do animal à diferentes tipos de estresse. Um estudo de Kalueff e col. (2009) mostrou que o estresse agudo pode ser responsável pela alteração na ocorrência do *grooming* e na ruptura de sua padronização. No mesmo estudo, ratos foram submetidos à um procedimento chamado pelos autores de estresse social induzido, uma exposição do animal com um co-específico, que resulta na submissão, ou subordinação de um dos animais; como resultado, os ratos subordinados apresentaram maiores níveis de ansiedade e padrões desorganizados dos comportamentos de *grooming*, o que segundo os autores, indicam um marcador de estresse social.

Nunes, Pezzato e Hoshino (2012) realizaram um estudo em relacionando o *grooming* com a privação de sono paradoxal. Inicialmente, os animais foram mantidos em uma gaiola viveiro com maravalha com a função de sujar o pelo dos animais. Logo após, os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico por 15 segundos e expostos à um ruído de alta intensidade por 60 segundos. O grau de limpeza corporal de ratos com níveis altos de ansiedade foi comparado ao ratos controles, após 96 horas de privação de sono paradoxal. Como resultado, os animais mais limpos, foram os que apresentaram “wild running” durante o teste sonoro (deslocamento em alta velocidade na caixa, saltos e *rearing*) enquanto os ratos resistentes à estimulação sonora estavam mais sujos. Segundo os autores, os dados sugerem que o *grooming* pode ser entendido como componente de um repertório de comportamentos ansiosos com função tranquilizadora que o cuidar do corpo apresenta, visto a elevada dependência que os ratos apresentam na detecção de informação sensorial, principalmente através do toque e olfato.

Drogas podem modelar o estresse e o *grooming*. Um estudo de Spasojevic, Gavrilovic, Varagic e Dronjak (2007) avaliou o efeito da administração crônica de uma dose baixa de diazepam, um benzodiazepínico, sobre o comportamento de *grooming* em

ratos expostos ao isolamento social por 21 dias. Foram encontrados vários efeitos incluindo mudança de peso do animal, defecação e micção. A administração de 0.2 mg/kg produziu efeitos ansiolíticos em comportamentos distintos do grooming (defecação, micção, freezing) e em alguns aspectos da microestrutura do comportamento de grooming. Os resultados mostraram que o isolamento social reduziu a duração do *grooming* e prolonga o período de tempo para início do *grooming*.

D'Áquila, Peana, Carboni e Serra (2000) investigaram a interação entre o estresse moderado de restrição, estresse leve crônico e a administração de desipramina, um antidepressivo tricíclico. O estresse moderado consistiu em expor os seguintes estressores em uma ordem aleatória: privação de comida, água e mudança de ratos na gaiola duas vezes na semana e iluminação do biotério no período noturno e isolamento, uma vez na semana. A restrição consistiu em imobilizar os ratos em um cilindro plástico por 1 hora por dia, imediatamente após a administração de desipramina. Tanto a restrição como o estresse crônico tiveram duração de sete semanas. Os animais que foram expostos à restrição de movimento tiveram aumento no *grooming*; já os ratos que também sofreram restrição mas receberam desipramina apresentaram uma duração menor no tempo total de *grooming*. Quanto aos animais expostos ao estresse crônico, a desipramina aumentou a atividade de *grooming*. A atividade exploratória foi reduzida pelo estresse crônico leve, independente do tratamento medicamentoso; já em relação aos grupos expostos ao estresse de restrição, não foram encontradas alterações.

Zimprich, Garret, Deussing e col. (2014) apresentaram um teste não-invasivo avaliando a responsividade de estresse em camundongos no campo aberto. O procedimento consistiu em imobilizar os camundongos em pequenos tubos de plástico de 50 ml ventilados e a seguir submetê-los ao teste de campo aberto por 5 minutos. Para avaliar qual duração de estresse levaria a mudanças comportamentais, os pesquisadores aplicaram

diferentes durações de estresse por restrição de comportamentos: 15 minutos, 50 minutos e 2 horas. Apenas a imobilização de duas horas, levou a um aumento robusto na locomoção e comportamentos de *rearing* (levantar-se). Nesse sentido, a locomoção e o comportamento de *rearing* em campo aberto após um episódio de estresse agudo podem ser utilizados como indicadores não-invasivos de estresse. Contudo, o comportamento de *grooming* não era o foco de análise dos pesquisadores.

Mostofsky e Buynitsky (2009) elaboraram um artigo de revisão sobre o estresse de contenção. De acordo com os autores, a contenção ou imobilização estão entre os métodos mais utilizados para a indução de estresse em animais por se tratar de um procedimento indolor, com baixo custo, fácil execução, e não causa nenhuma debilitação duradoura no animal. Segundo os mesmos autores, os procedimentos de contenção limitam os movimentos de membros específicos; já a imobilização é descrita como a redução do raio de locomoção do animal, como alocando-os em pequenos discos, por exemplo. Entre os métodos de contenção mais utilizados estão: envolver todo o animal em um cone plástico rígido; envolver todo o animal em redes de arame ou envolver todo o animal em um tecido, com várias camadas.

Situações de estresse podem ser moduladoras do comportamento de *grooming*. O prolongamento das sessões mostra que eventos aversivos alteram tanto o curso temporal quanto a distribuição anatômica (rostral e corporal) de episódios de *grooming* (Estanislau 2012, Van Erpet al., 1994). No entanto, por ser um comportamento que pode aparecer mesmo com o animal calmo, ainda é necessário estabelecer plenamente a forma que o *grooming* assume no estresse. Nesse sentido, o presente projeto teve por objetivo; a) Investigar os efeitos do *grooming* induzido por estresse de restrição de movimentos; b) investigar o efeito de diferentes durações de contenção de movimento e diferentes intervalos de tempo entre restrição e o teste em uma caixa de acrílico.

## **Material e Método**

### **Sujeitos**

Foram utilizados 70 ratos da linhagem *Wistar* alojados no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC) da Universidade Estadual de Londrina. Os ratos ficaram em ciclo claro/escuro 12/12 horas (luzes acessas às 7:00 h), em temperatura controlada ( $23^{\circ}\pm 2^{\circ}$ ) sob regime *ad libitum* de água e comida. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL 084/2014).

### **Protocolo de Estresse**

Os ratos foram distribuídos em sete grupos (tabela 1) com o intuito de produzir diferentes níveis de estresse nos animais. Foram utilizadas três medidas de restrição, representadas por “R” (R15 minutos, R30 minutos e R120 minutos) e dois intervalos de tempo entre a restrição e o teste na caixa de acrílico, representados por “I” (I0 minutos e I20 minutos). Os grupos foram divididos em Controle, R15 I0, R30 I0, R120 I0, R15 I20, R30 I20, R120 I20. O tempo de restrição foi baseado no estudo de Zimprich, Garret, Deussing e col. (2014).

Depois de retirados do biotério, os ratos foram habituados por 30 minutos a uma sala adjacente à sala de testes. Após a habituação, cada rato foi isolado individualmente em um aparato de tela de arame de formato cônico, moldado ao corpo do animal, de modo a restringir seus movimentos das patas e cabeça, impedindo que gire em torno de si. Em seguida foram pendurados verticalmente com a cabeça para cima, em um suporte de madeira por um tempo determinado, de acordo com o grupo pertencente (exceto o grupo controle que foi manipulado diretamente da caixa familiar, para o teste na caixa de acrílico). A tela de arame e a posição vertical de permanência foram escolhidas por permitir

evitar que a defecação sujasse os pelos do animal. Em seguida, foi realizado o teste em uma caixa de acrílico, com as medidas de 30cmx30cmx30cm em que o animal foi colocado no centro da caixa e permaneceu por 20 minutos. Um espelho foi disposto embaixo da caixa, para melhor registro das sessões. As sessões foram registradas com uma filmadora Sony. Após a realização do experimento, os ratos foram alojados novamente no biotério.

*Tabela 1 - Descrição sumarizada do procedimento experimental*

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Restrição (min)</b>	Controle	15	30	120	15	30	120
<b>Intervalo T – (min)</b>	Controle	0	0	0	20	20	20

*Tabela 1. Delineamento Experimental:* a linha “Restrição” indica a quantidade de tempo em minutos em que o animal esteve imobilizado na rede de arame. A linha Intervalo/Teste indica o intervalo de tempo em que o animal foi submetido à caixa familiar com maravalha entre o isolamento na rede e o teste de observação na caixa de acrílico.

Foi utilizado o software X-plo Rat 2005 para o registro das categorias comportamentais, divididas em:

- a) Duração do *Grooming* rostral (movimento de lambar as patas e fricção no nariz, vibrissas e orelhas)
- b) Duração do *Grooming* corporal (movimentos de lambar e friccionar com as patas e focinho, outras regiões do corpo).
- c) Duração total do *Grooming* (*grooming* rostral e *grooming* corporal somados)
- d) Frequência de Cadeias Estereotipadas

- e) Frequência da Locomoção (baseada na mudança de quadrantes da caixa de acrílico 30x30x30)

### **Análise de dados**

Foi realizado o teste Shapiro-Wilk a fim de verificar se os dados seguiam uma distribuição normal. Todas as medidas falharam no teste de normalidade; por isso, os grupos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Os resultados estão dispostos na seguinte ordem: total de *grooming*, *grooming* rostral, *grooming* corporal, cadeias e locomoção. Os dados de cada categoria estão sequencialmente apresentados em primeiros 5 minutos, primeiros 10 minutos e primeiros 20 minutos de sessão.

### **Total de *Grooming***

Referente ao total de *grooming* (*grooming* rostral e *grooming* corporal) foram encontradas diferenças significantes nos primeiros 5 minutos de sessão ( $H=13$   $p<0,05$ ). Contudo, o teste de Dunn não indicou diferenças entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

Em relação aos primeiros 10 minutos de sessão, Foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=24.6$   $p<0,05$ ) porém o teste de Dunn não indicou diferenças entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

Em relação 20 minutos totais de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=28,1$   $p<0,05$ ). Novamente, o o teste de Dunn não indicou diferenças entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

A seguir, a Figura 1 representa a duração do total de *grooming* em 5, 10 e 20 minutos:

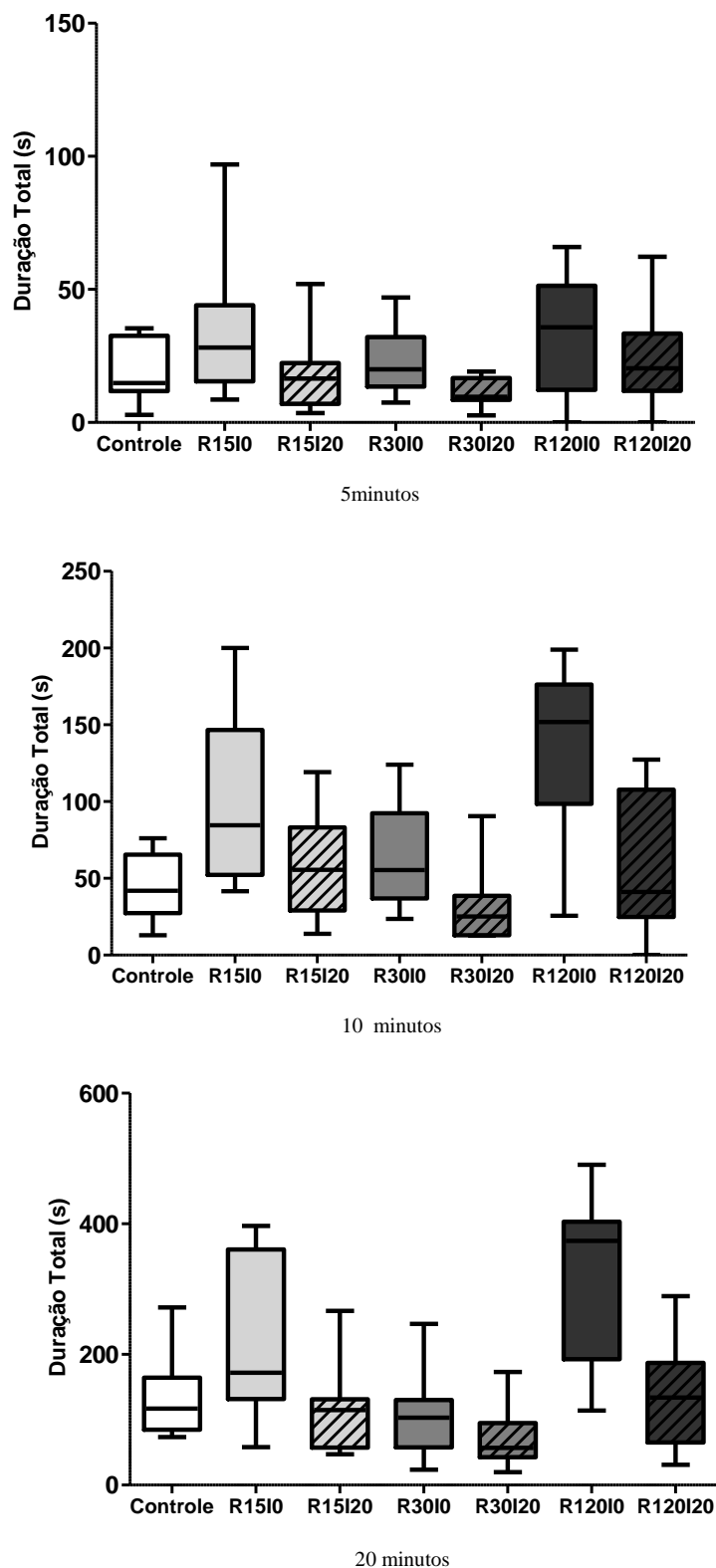


Figura 1 -Duração total do grooming 5,10 e 20 minutos(mediana, mediana, variação interquartil, max-min)

Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste.(H=13; H=24; H=17,9  $p<0,05$ )

### **Grooming Rostral**

Referente ao *grooming* rostral, foram encontradas diferenças significantes nos primeiros 5 minutos de sessão ( $H=10,8$   $p<0,05$ ). No entanto, o teste de Dunn não indicou diferenças significantes entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

Em relação aos primeiros 10 minutos de sessão, Foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=17,9$   $p<0,05$ ). Entretanto, o teste de Dunn não indicou diferenças entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

Em relação aos 20 minutos totais de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=28,1$   $p<0,05$ ). O teste de Dunn indicou diferenças entre o grupo R30I20 (mediana=98,8) e o Controle (mediana=93,06) com  $p<0,05$ .

A seguir, a Figura 2 representa a duração do *grooming* rostral em 5, 10 e 20 minutos:

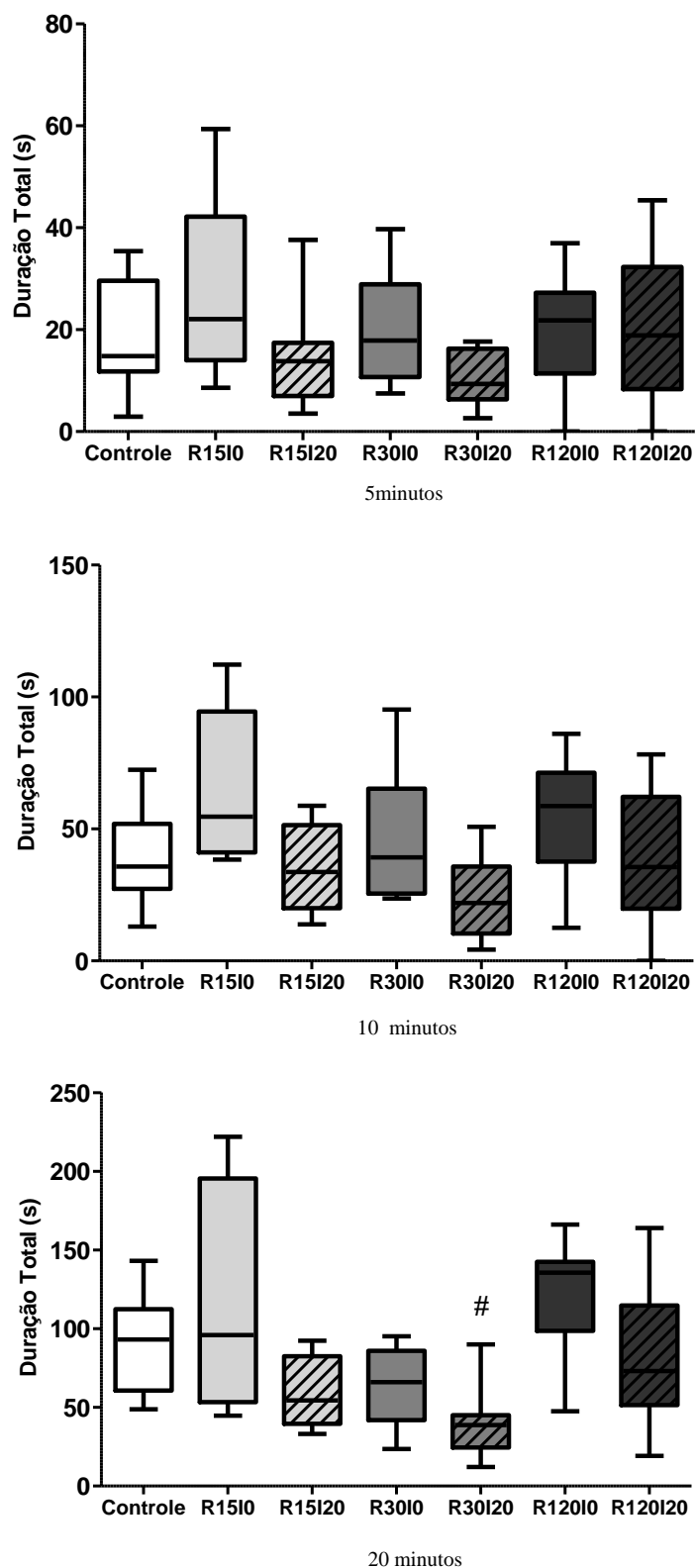


Figura 2- Duração do grooming rostral em 5,10 e 20 minutos (mediana, variação interquartil, max-min).

Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (I0 ou 20 min) entre a restrição e o teste. # Diferença significativa no teste de Dunn ( $p < 0,05$ ); R30I0 (mediana=38,8) em relação ao grupo Controle (mediana=93,03)

### ***Grooming Corporal***

Referente ao *grooming* corporal, foram encontradas diferenças significantes nos primeiros 5 primeiros minutos de sessão ( $H=14,9$   $p<0,05$ ). O teste de Dunn indicou diferença significante entre os grupos R120I0 (mediana=11,775) e o Controle (0)

Em relação aos 10 primeiros minutos de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=27,7$   $p<0,05$ ). Novamente, o teste de Dunn indicou diferença significante entre os grupos R120I0 (mediana=81,76) e o Controle (mediana=1,596) com  $p<0,05$ .

Em relação aos 20 minutos totais de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=24,4$   $p<0,05$ ). O teste de Dunn indicou diferenças significantes entre o grupo R120I0 (mediana=231,627) e o Controle (mediana=35,42). Já entre os grupos com intervalo 0 minutos, foi encontrada diferenças significante entre R30I0 (mediana=30,96) e R120I0 (mediana=231,627)

A seguir, a Figura 3 representa as durações do *grooming* corporal em 5, 10 e 20 minutos respectivamente:

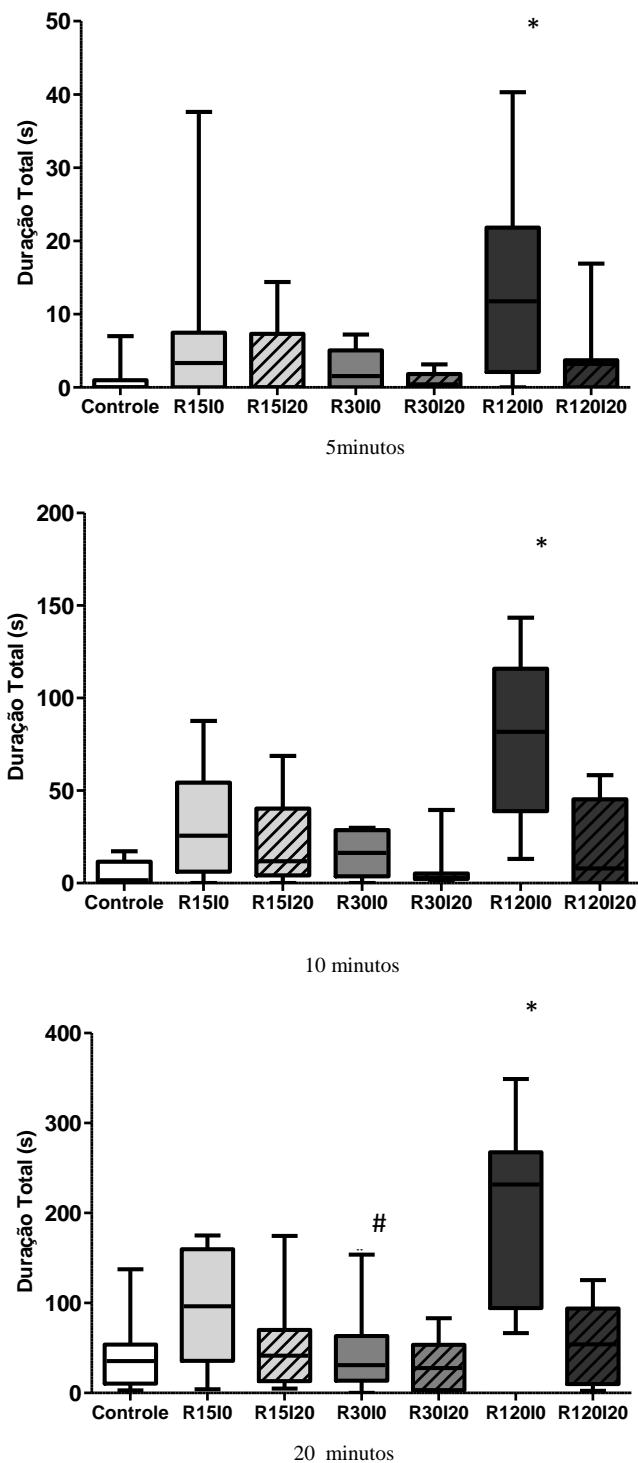


Figura 3 -Duração do grooming corporal em 5, 10 e 20 minutos (mediana, variação interquartil, max-min). Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste.

\*Diferença significativa no teste de Dunn ( $p < 0,05$ ) em 5, 10 e 20 minutos respectivamente; R120I0 (mediana=11,775) e Controle (mediana = 0); R120I0 (mediana=81,76) e Controle (mediana 1,596); R120I0 (mediana=231,6) e Controle (mediana=35,4)

#Diferença significativa no teste de Dunn ( $p < 0,05$ ); R120I0 (mediana 231,6) e R30I0 (mediana=30,9)

### **Cadeias Estereotipadas**

Referente às cadeias estereotipadas, nos primeiros 5 minutos, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H=14,3$   $p<0,05$ ). No entanto, o teste de Dunn não indicou diferenças entre o grupo controle e qualquer outro grupo, nem mesmo entre grupos com a mesma duração de restrição ou com o mesmo intervalo restrição-teste.

Em relação aos primeiros 10 minutos, foi encontrada diferença significativa entre os grupos ( $H=19,4$   $p<0,05$ ). O teste de Dunn indicou diferença significativa entre o grupo R120I0 (mediana=3) e o grupo Controle (mediana=0).

Nos 20 minutos totais de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $H= 25$   $p<0,05$ ). Novamente, o teste de Dunn indicou diferença significativa entre o grupo R120I0 (mediana=4,5) e o grupo Controle (mediana=1,5)

A seguir, a Figura 4 representa a frequência de cadeias estereotipadas nos primeiros 5, 10 e 20 minutos sequencialmente:

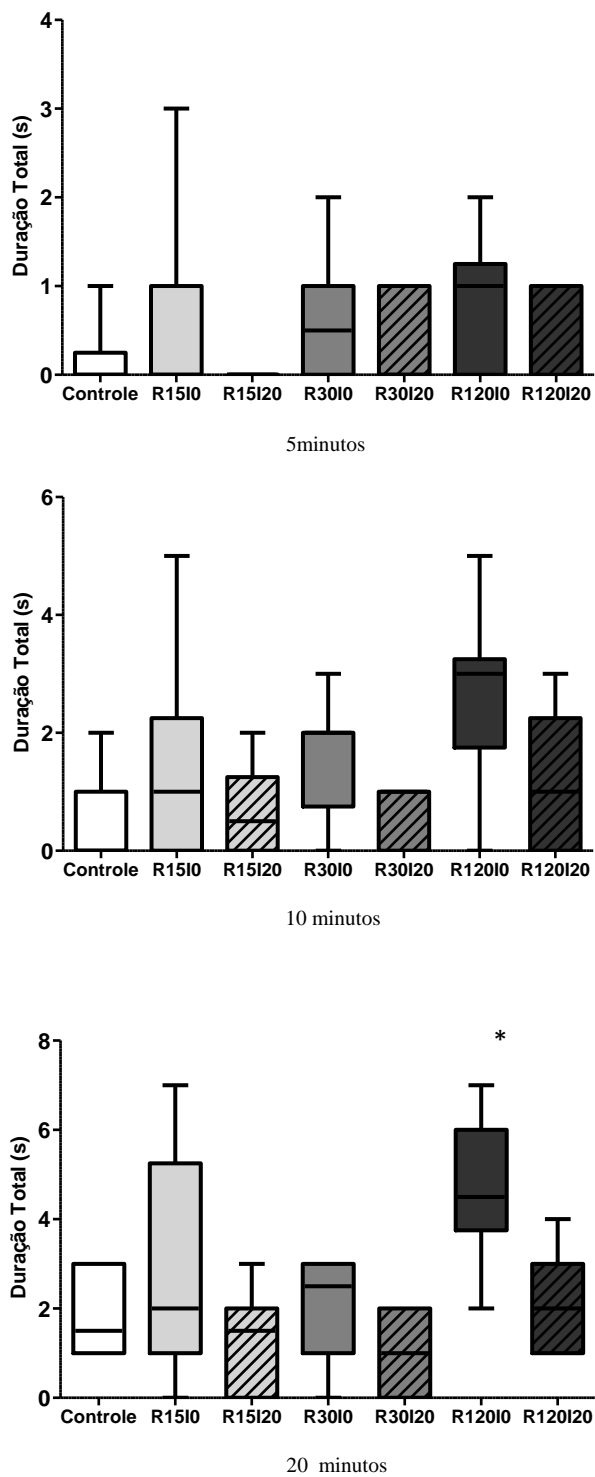


Figura 4 –Frequência de cadeias estereotipadas em 5,10 e 20 minutos(mediana, variação interquartil, max-min). Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (10 ou 20 min) entre a restrição e o teste

\*Diferença significativa no teste de Dunn ( $p < 0,05$ ) em 10 e 20 minutos respectivamente; R120I0 (mediana=3,0) e Controle (mediana=0) e R120I20 (mediana=4,5) e Controle (mediana 1,5)

## Locomoção

Em relação à locomoção, não foram encontradas diferenças significantes entre grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis. A Figura 5 representa os resultados encontrados em 5, 10 e 20 minutos respectivamente:

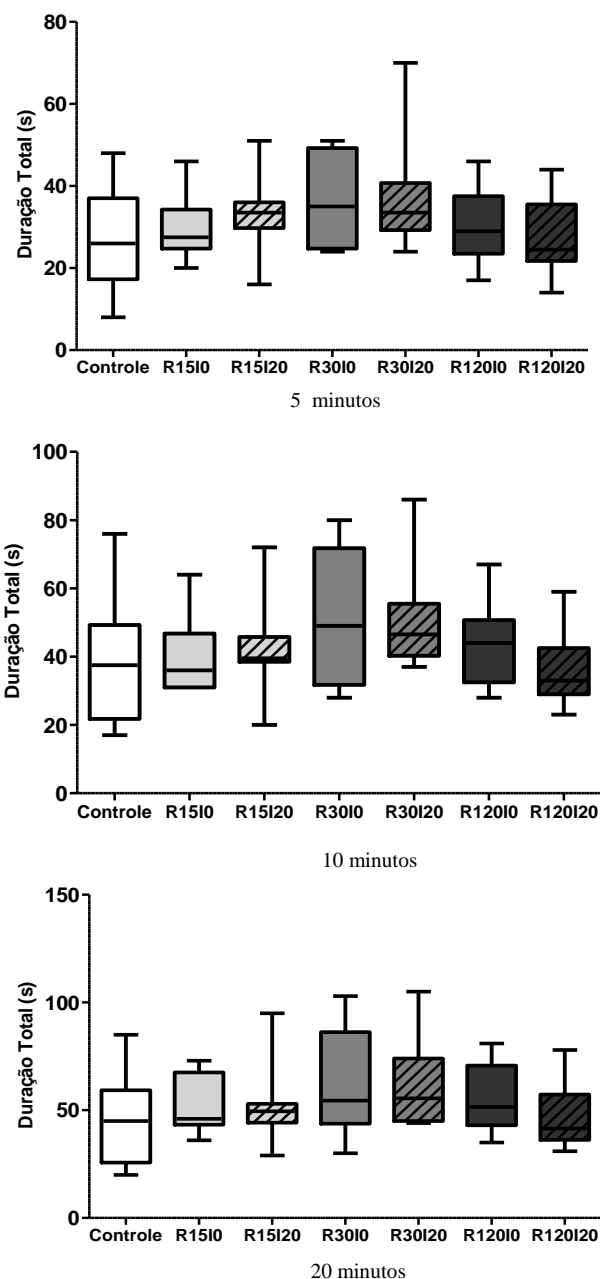


Figura 5 –Frequência de locomoção em 5,10 e 20 minutos(mediana, variação interquartil, max-min).Ratos foram testados sem qualquer perturbação prévia ou após diferentes intervalos de restrição (R15, 30 ou 120 min) e com ou sem intervalo (I0 ou 20 min) entre a restrição e o teste.O teste de Kruskal Wallis não indicou diferenças significantes diferenças entre os grupos.

## Discussão

Este estudo teve por objetivo investigar o *grooming* quanto marcador não-invasivo de estresse agudo por contenção. O *grooming* foi dividido em rostral e corporal. As cadeias estereotipadas, que consistem em uma sequência céfalo-caudal mais rígida nos comportamentos de *grooming*, também foram quantificadas. As sessões tiveram a duração de 20 minutos, na medida em que sessões de 5 minutos, muitas vezes não são suficientes para a avaliação do efeito de estressores no *grooming* (Estanislau, 2012; Velozo, 2012).

Margis, Picon, Cosner e Silveira (2003) apontam que o tipo de resposta do organismo frente à situação estressora depende da magnitude, frequência e duração do evento estressor. Para os autores, o aumento dos níveis de ansiedade está relacionado à frequência e duração de respostas de ativação fisiológica. Nesse sentido, as variações na duração do *grooming* podem ser consideradas respostas de enfrentamento envolvidas na diminuição da excitação (*dearousal*) e ativação fisiológica causadas pelo estresse de contenção.

No procedimento, a contenção pela tela de arame (Buynitsky e Mostofsky 2009) foi a variável responsável por produzir estresse aos animais. Esta variável foi explorada em diferentes níveis: 15, 30 e 120 minutos de contenção em complemento com exposição direta ao teste ou com 20 minutos de intervalo na gaiola familiar. Os intervalos entre contenção e teste foram utilizados com o intuito de testar se haveria mudanças nos efeitos estressores da contenção. A exposição a ambiente novo era inerente à sessão de teste e foi aplicada a todos os grupos.

Em todas as categorias de *grooming* definidas (total, rostral e corporal) os grupos sem intervalo entre a contenção e o teste apresentaram maior duração de *grooming* em comparação à seus análogos com intervalo. É importante destacar que o *grooming* ocorreu

em maior frequência nos primeiros 15 minutos de sessão em todos os grupos. Muitos animais após um período de 15 minutos, principalmente os pertencentes aos grupos com intervalo, mantinham-se deitados e alguns até dormiam nos minutos finais da sessão, o que pode indicar sinais de habituação, o que diminui os níveis de ansiedade.

As maiores durações de *grooming* total, que consiste no *grooming* rostral somado ao corporal, foram encontrados nos grupos R120I0 e R15I0. O intervalo de 20 minutos foi suficiente para diminuir as durações de *grooming* nos dois grupos citados. Notou-se pouca variação na duração de *grooming* entre todos os grupos. Não foram encontradas diferenças significantes em nenhum dos tempos de análise (5, 10 e 20 minutos). Contudo, foi notado que o grupo exposto ao estressor mais severo R120I0, apresentou maiores taxas de *grooming* total. Isso se deve ao fato das altas durações de *grooming* corporal neste grupo. Nin, Natividade, Pereira, Souza e col (2012) apontam que o *grooming* pode variar em sua distribuição regional de acordo com a intensidade do estresse sofrido. Ao que parece, os resultados deste estudo mostram o aumento da atividade de *grooming* quando o teste não é seguido de intervalo após restrição.

D'Áquila, Peana, Carboni e Serra (2000) também notaram o aumento de *grooming* em um procedimento em que os ratos foram expostos ao estresse de restrição de movimentos em tubos plásticos durante 1 hora por dia, ao longo de sete semanas. A administração de desipramina diminuiu a ocorrência de *grooming*. No entanto, os pesquisadores não fizeram a separação entre *grooming* rostral e corporal e não analisaram cadeias sintáticas. Esses resultados abrem margem para especulação do efeito imediato de uma única imobilização e o efeito progressivo de restrições repetidas. Qual será então, a distribuição regional de *grooming* após um regime progressivo de imobilização? O aumento da restrição para duas horas diárias em um regime progressivo teria efeito nos resultados finais? A desipramina diminuiria o *grooming* após um único procedimento

deimobilização de duas horas? Essas investigações podem ajudar a traçar uma linha sobre a tolerância nos efeitos do estresse por restrição.

Em específico ao *grooming* rostral, nos experimentos de Velozo (2012), foram notadas poucas variações nos diversos contextos utilizados; labirinto em cruz elevado, teste de enterramento de bolas, extinção operante e imobilização. Para Kalueff e Touhimaa (2005b) e Estanislau (2012) a variação de *grooming* rostral durante a sessão pode ser um indicativo de estresse ou ansiedade. Nos resultados do presente estudo, poucas foram as variações de *grooming* rostral no decorrer das sessões em todos, com exceção do grupo R30I20 em 20 minutos. Foi encontrada uma diferença significativa entre R30I20 e o controle ou seja, R30I20 apresentou duração menor de *grooming* rostral que o controle. Estes dados indicam que os efeitos do estresse por restrição no *grooming* rostral não foram claramente encontrados. Apesar do grupo R120I0 apresentar maiores durações de *grooming* rostral, principalmente quando olhamos para o tempo total da sessão, não foram encontradas diferenças significantes em comparação com o controle ou entre ele e seu análogo com intervalo.

Em específico ao *grooming* corporal, foram encontradas maiores durações no grupo R120I0. Mesmo nos primeiros 5 minutos de sessão, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo R120I0 e o controle. Contudo, esta diferença se deve ao fato de que não foi registrada ocorrência de *grooming* corporal no grupo controle nos primeiros 5 minutos, o que reforça o argumento de Estanislau (2012) e Velozo (2012) de que sessões superiores à 5 minutos possibilitam melhores condições para a observação do *grooming*.

A superioridade do grupo R120I0 em relação ao controle manteve-se no *grooming* corporal em 10 e 20 minutos de sessão. De acordo com Komorowska e Pisula (2003) o *grooming* corporal está relacionado ao enfrentamento de situações estressoras ou

habituação a um contexto estressor. Considerando que o grupo R120I0 sofreu maior período de restrição, este resultado parece lógico. Houve decréscimo na duração de *grooming* com apenas 20 minutos de intervalo. Isto pode fornecer pistas do efeito de tolerância que este tipo de estressor pode oferecer. Para Nunes, Pezzato e Hoshino (2012) a hipótese do *grooming* ter a função de diminuir a ansiedade frente às situações de risco pode ser encontrada na grande dependência de detecção sensorial dos ratos, através do toque e olfato. A constatação de maiores durações de *grooming* em situações estressantes se dá na medida em que o aumento dos níveis de alerta, causados por uma situação estressora ou de perigo, sinalizam a necessidade de emissão de comportamentos defensivos com maior prioridade. No caso deste estudo, a contenção pela rede de arame é o evento eliciador de estresse

Para Fentress (1988) existem situações mais prováveis para o aparecimento do *grooming*, como o período de habituação ou entre fases opostas de contexto. É provável que os efeitos estressores da contenção sejam transitórios, os quais 20 minutos após a imobilização já não estariam mais presentes. Esta afirmação corrobora com os resultados encontrados. Os grupos que tiveram intervalo na gaiola familiar antes do teste na caixa de acrílico apresentaram menores durações de *grooming* e de cadeias sintáticas.

Berridge, Aldridge, Houchard e Zhuang (2005) apontam que as cadeias sintáticas (ou estereotipadas) podem ser facilmente reconhecidas por uma série de movimentos divididas em 4 fases. As cadeias sintáticas têm menor probabilidade de ocorrer em contextos pouco ansiogênicos. Se por um lado, estressores não-agudos podem contribuir para o aparecimento de cadeias, o excesso de aversividade pode produzir comportamentos de congelamento no animal. Os resultados deste trabalho, indicam que a restrição de 2 horas e testagem imediata promoveram o aumento na ocorrência das cadeias sintáticas; já os outros grupos não mostraram semelhante aumento na ocorrência das cadeias.

De acordo com Berling et al (2011) e Blanchard e Blanchard (1986) é natural o aumento de atividade exploratória em contextos de novidade. O contexto de novidade compartilhado por todos os grupos foi a exposição à caixa de acrílico. Contudo, em relação à locomoção, não foram encontrados diferenças significantes entre os grupos. D'Áquila, Peana, Carboni e Serra (2000) também não encontraram mudanças significantes na locomoção no experimento já citado anteriormente. Já Zimprich et al. (2014) encontraram diferenças significantes na locomoção após 2 horas de contenção em tubos plásticos em um experimento realizado com camundongos.

Analisando o experimento como um todo, pode-se constatar que; os animais foram habituados à sala em que foi realizado o experimento por 20 minutos, dentro da gaiola viveiro. Logo após, foram submetidos à contenção (15, 30 e 120 minutos). A contenção foi feita de maneira súbita, o que causou em muitos animais, micção, defecação e tensão muscular, sinais de medo e ansiedade (Rivera 2002). Neste ponto, ou o animal foi exposto imediatamente à caixa de acrílico ou voltou para a gaiola viveiro. Os animais que voltaram à gaiola viveiro, retornaram à um contexto já conhecido. Em seguida, foram expostos à novidade da caixa de acrílico. Sugere-se que o estresse causado pela novidade da caixa seja mais brando que o causado pela contenção, na medida em que os mesmos comportamentos de micção, defecação e tensão muscular não foram encontrados ao serem colocados na caixa teste. Estes mesmos grupos apresentaram menor duração de grooming e de cadeias sintáticas nas sessões. Nesse sentido, passaram pelas situações: habituação, estresse agudo, possível habituação e novidade. Como habituação, entende-se o cessar ou diminuição de comportamentos de alerta, novidade (rearing, locomoção) e diminuição dos níveis de ansiedade (Bronstein, Neiman, Wolkoff e Levine 1974).

Os animais que não voltaram para a gaiola viveiro, passaram de uma condição de habituação à sala na gaiola viveiro, estresse agudo por contenção e novidade. Alguns

animais do grupo R120I0 apresentaram os mesmos comportamentos de micção, defecação e tensão muscular ao serem colocados na caixa de acrílico e também foram os que apresentaram maiores durações de grooming, com destaque para o corporal e maior número de cadeias sintáticas. Nesse sentido, os efeitos de habituação da gaiola familiar podem ter diminuído os níveis de ansiedade causados pela contenção. Na maioria dos grupos, a sucessão do estressor agudo para a novidade fez com que os animais apresentassem sinais de habituação na caixa de acrílico após os primeiros 15 minutos de sessão, como diminuição das durações de grooming, sono e diminuição da locomoção, com exceção do grupo R120I0. Para estudos futuros, é sugerido que seja feita a coleta de dados também seja feita nos animais durante o intervalo na caixa familiar. Com isso, espera-se encontrar dados sobre uma possível habituação e dados sobre o grooming em um ambiente já conhecido pelo animal, sem o contexto de novidade da caixa de acrílico.

Em síntese este trabalho proporcionou os seguintes resultados: em relação ao tempo de contenção, apenas a duração de duas horas mostrou-se efetiva para produzir mudanças significantes no *grooming* corporal e na frequência de cadeias estereotipadas, o que é um indicativo do envolvimento do *grooming* no “*dearousal*”. Em relação ao tempo de sessão, 10 minutos é o tempo mínimo recomendado para a investigação do *grooming*, visto que os resultados foram significativamente parecidos com o tempo de sessão de 20 minutos. O intervalo de 20 minutos entre a contenção e o teste foi suficiente para diminuir drasticamente a duração do *grooming* em todos os grupos. Em relação ao material utilizado no experimento, as redes de arame se mostraram uma alternativa eficaz e de baixo custo para a contenção dos animais. Futuras investigações que variem o intervalo entre contenção e teste podem fornecer dados sobre a tolerância e duração nos efeitos do estresse por contenção.

## Considerações Finais

Os resultados obtidos replicam parcialmente os resultados de Zimprich et al. (2014); Imediatamente após um período de duas horas de contenção de movimentos, os ratos apresentaram aumento na atividade de *grooming*, composta por *grooming* rostral, corporal e cadeias estereotipadas. Em relação à distribuição regional, o *grooming* corporal apareceu como medida de maior relevância para o estudo. Contudo, apesar da alta duração de *grooming* corporal após a restrição de duas horas, o intervalo entre a contenção e teste foi suficiente para suprimi-lo drasticamente, o que pode indicar a curta duração do efeito estressor da contenção. Ao contrário dos resultados de Zimprich et al. (2014), não foram encontrados efeitos do estresse de restrição na locomoção. Além disso, 15 e 30 minutos de contenção não são suficientes para a investigação do *grooming* rostral neste contexto.

O *grooming* pode ser modulado por diversos contextos, como a privação de sono paradoxal, exposição à novidade, medo condicionado, labirinto em cruz elevado, e como no caso deste estudo, contenção (Nunes, Pezzato e Hoshino 2012 e Veloso 2012 ). A variação e diferentes configurações destes contextos podem ajudar a ressaltar a importância do *grooming* e sua distribuição regional como um marcador de ansiedade de fácil detecção, modulação e contribuir para investigações sobre futuras sobre estresse e ansiedade.

Em conclusão, pode se inferir que os resultados obtidos abrem margem para a realização de novos experimentos, por exemplo, realizando um número maior de sessões (re-teste) para analisar a tolerância dos efeitos estressores da contenção e a distribuição regional de *grooming*. Por outra perspectiva, é possível investigar o efeito da administração de drogas benzodiazepínicas na duração de *grooming* corporal, na medida em que esta categoria de *grooming* se mostrou mais significativa neste procedimento; se isto vier a

ocorrer, importantes dados sobre o *grooming* como um modelo de ansiedade e estresse podem ser encontrados.

## Referências

- Beerling, W., Koolhaas, J., Ahnaou, A., Bouwknecht, J., Boer, S., Meerlo, P., & Drinkenburg, W. (2011). Physiological and hormonal responses to novelty exposure in rats are mainly related to ongoing behavioral activity. *Physiology & Behavior*, 103, 412-420
- Berridge, K.C. (1990). Comparative fine structure of action: rules of form and sequence in the grooming patterns of six rodent species. *Behavior*, 113(1-2), 21-56.
- 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.
- Borges, C. S., Golçalves-Luiz, A. M., Domingos, N. A., (2009) Intervenção cognitivo comportamental em estresse e dor crônica. *Arq Ciênc Saúde out-dez*, 16(4):181-6
- Bressers, W. M., Kruk, M. R., Erp, A. M., Willekens-Bramer, D. C., Haccou, P., & Meelis, E. (1995a). Time Structure of Self-Grooming in the Rat: Self-Facilitation and Effects of Hypothalamic Stimulation and Neuropeptides. *Behavioral Neuroscience*, 109(5), 955-964.
- Bronstein, P. M. Neiman, H., Wolkoff, D., Levine, J. (1974) The development of habituation in the rat. *Animal Learning & Behavior*. 2, 92-96
- Buynitsky, T., Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 33, 1089-1098.
- Clinton, S. M.; Watson, S. J.; Akil, H. (2014) High Novelty-Seeking Rats Are Resilient to Negative Physiological Effects of the Early Life Stress. *Stress*. 17, 97-107
- D'Aquila, P. S.; Peana, A. T.; Serra, G. (2000) Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. *European Journal of Pharmacology*. 399 33-47.
- Estanislau, C., Ramos, A. C.; Ferraresi, P. D.; Costa, N. F., de Carvalho, H. M., Batistela, S. (2011). Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behavioural Processes*, 86, 46-51
- Estanislau, C. R. (2012) Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*. 1 -105-112
- Estanislau, C. R.; Díaz-Moran, S.; Canete, T.; Blázquez, G.; Tobeña, A.; Fernandez-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, 187-201

- Fentress, J. C. (1988). Expressive contexts, fine structure and central mediation of rodent grooming. *Annals New York Academy*. 525, 18-26
- Fernandez, J. L.; Mello Cruz, A.; Brandão, M. L. (2006) Padrões de resposta defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. *Psicologia USP*, 17 (4), 175-192.
- Franci, C. R.. (2005) Estresse: Processos adaptativos e não-adaptativos. *Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*. Guanabara Koogan, 1, 210-220
- Geyer, A. G.; & Markou, A. (1995). Animal models of psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology. The Fourth Generation of Progress*. New York. Ed: Raven Press. 789-798
- Gispén, W., & Isaacson, R. (1981). ACTH-induced excessive grooming in the rat. *Pharmacology & therapeutics*, 12(1), 209-246.
- Greer, J. M., Capecchi, M. R. (2002). Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*, 33, 23-24.
- Kalueff, A., & Tuohimaa, P. (2005a). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology*, 508, 147-153.
- Kalueff, A., & Tuohimaa, P. (2005b). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143(2), 169-177.
- Komorowska, J., & Pisula, W. (2003). Does changing levels of stress affects the characteristics of grooming behavior in rats? *International Journal of Comparative Psychology*, 16, 237-246.
- Marroni, S. S. (2005) Substratos neuroanatômicos e celulares do comportamento de autolimpeza exacerbada (*hypergrooming*) induzido pela injeção de ocitocina no núcleo central da amígdala. Um modelo experimental de transtorno obsessivo-compulsivo. *Dissertação apresentada como requisito para o título de mestre pelo curso de pós-graduação em neurociências pela Universidade de São Paulo*, 01-50.
- Margis, R.; Picon, P.; Cosner, A. F.; Silveira, R. O. (2003) Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Revista Psiquiatria*. 25, 65-74.
- Nin, M.; Couto-Pereira, N. Souza, M.; Azeredo, L.; Ferri, M. (2012) Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. *European Journal of Pharmacology*. 1-3 95-101
- Nunes, H. C., Pezzato, F. A., Hoshino, K. (2012) Self-grooming, experimental anxiety and paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Science*. (1):19,23
- Radley, J., Kabbaj, M., Jacobson, L., Heyndael, W., Yehuda, R., Herman, J. (2013) Stress risk factors and stress-related pathology: neuroplasticity, epigenetics and endophenotypes. *Stress*. Sep; 14(5): 481-497.

Rivera, E. A. B.; (2002) Estresse em animais de laboratório. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Ed. Fiocruz. 263-272

Spasojevic, N., Gavrilovic L., Varagic, V. V., Dronjak, S. (2007). Effects of chronic diazepam treatments on behavior on individually housed rats. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 59 (2), 113-117

Seyle, H. A. A Syndrome produced by diverse nocuous agents. (1936) *Nature*.138, 32

Spruijt, B., van Hoof, J., &Gispen, W. (1992).Ethology and neurobiology of grooming behavior.*Physiological Reviews*, 72(3), 825-852.

vanErp, 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.

Zimprich, A.; Garret, L.; Deussing, J.; Wotjak, C.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; de Angelis, M.; Wurst, W.; Holter, S. (2014).A robust and reliable non-invasive test for stress responsivity in mice.*Frontiers in Behavioral Neuroscience*.Apr 15;8:125.

Zuardi, A. W. Fisiologia do estresse e sua influência na saúde. Disponível em: <[rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/fisiologia%20do%20estresse.pdf](http://rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/fisiologia%20do%20estresse.pdf)>.Acesso em: 25 de novembro de 2015.