



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DANIEL CONSTANTINO CUNHA

**IMPEDIR A RESPOSTA DE *GROOMING* TRADUZ EFEITO
REBOTE EM RATOS?**

DANIEL CONSTANTINO CUNHA

**IMPEDIR A RESPOSTA DE *GROOMING* TRADUZ EFEITO
REBOTE EM RATOS?**

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. Celio R. Estanislau.

Londrina
2016

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

Cunha, Daniel Constantino.

Impedir a resposta de grooming traduz efeito rebote em ratos? / Daniel Constantino Cunha. - Londrina, 2016.
xi, 24 f. : il.

Orientador: Celio 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. Análise do comportamento - Tese. 2. Stress (Psicologia) - Tese. 3. Ansiedade - Modelos animais - Tese. 4. Habituação (Neuropsicologia) - Tese. I. Estanislau, Celio Roberto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

DANIEL CONSTANTINO CUNHA

**IMPEDIR A RESPOSTA DE GROOMING TRADUZ EFEITO REBOTE
EM RATOS?**

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 R. Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de Maio de 2016

Dedico este trabalho à minha família, em especial
ao meu pai (*in memoriam*) e ao meu filho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e saúde para concluir o mestrado. Foi um período de muitas transformações, desafios e aprendizagens.

À minha esposa Cristina por todo apoio e dedicação que foram essenciais para a conclusão deste projeto.

Ao meu filho que muitas vezes ficou sem minha companhia em função dos trabalhos.

Ao meu pai Jose (*in memoriam*), à minha mãe Vera e às minhas irmãs Ana Lúcia e Juliana pelo apoio, carinho, atenção e acolhimento.

Ao Prof. Celio pelas orientações esclarecedoras e por me aceitar como orientando. O mestrado foi uma experiência difícil, mas fantástica e transformadora. O seu modo de encarar a ciência e de conduzir o laboratório certamente me inspirou. Hoje sou um profissional melhor e e boa parte disso devo à você.

Ao amigo Guilherme Filgueiras que tive o prazer de conhecer nesta caminhada e que sempre esteve disponível para me ajudar.

Ao pessoal do laboratório, em especial para Taimon Maio, Andresa Bibiano, Thiago Campoli e Lucas Ribeiro, pelo suporte, “quebradas” de galho, incentivo e companhia agradável.

Aos amigos Fabrício R. de Oliveira, André W. Gil e Victor H. Bassetto pelas conversas nas horas difíceis e incentivo.

À Prof.^a Maria de Lourdes Sperandio que sempre apoiou a realização deste mestrado.

E a todos que torcem por mim.

CUNHA, Daniel Constantino. **Impedir a resposta de grooming traduz efeito rebote em ratos?** 2016. 24f.. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A regulação do comportamento de grooming nos roedores tem sido estudada em situações estressantes ou ansiogênicas, contudo não há na literatura investigações sobre o efeito da prevenção da resposta de grooming. O presente trabalho teve por objetivo verificar o que ocorre com o comportamento de *grooming* após a sua prevenção. Foram utilizados 46 ratos Wistar no experimento. Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com as variáveis manipuladas: prevenção da resposta de *grooming* e novidade. A prevenção do grooming foi realizada por meio de um colar elisabetano, tendo como controle um colar estreito que não impedia as respostas de grooming. A novidade foi manipulada pela habituação à caixa de acrílico utilizada no dia do teste. Alguns ratos foram habituados previamente à caixa de acrílico, enquanto outros foram colocados nesta caixa pela primeira vez no dia do teste. Os resultados revelaram um efeito rebote, pois os ratos que passaram pela prevenção do grooming passaram mais tempo realizando este comportamento após a prevenção, independentemente da caixa de acrílico ser ou não ser uma novidade para o animal. Discute-se se este efeito rebote está relacionado a uma compensação da resposta que foi impedida ou como resposta de enfrentamento após um evento estressante.

Palavras-chave: *Grooming*. Prevenção. Novidade. Modelos animais de ansiedade.

CUNHA, Daniel Constantino. **Does the prevention of grooming response lead to rebound effect in rats?** 2016. 24p. Thesis, Behavioral Analysis Post Graduation Program, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The regulation of grooming behavior in rodents has been studied in stressful or anxiogenic environments. However, there are no reports of the effects of grooming prevention. The aim of this study was to verify the effects of grooming prevention on its presentation latter on. Fourty six Wistar male rats were used in the experiment. The rats were divided into four groups according to the manipulated variables: grooming prevention and novelty. Grooming prevention was provided by means of an Elizabethan collar. A control collar was used to provide similar tactil stimulation but did not prevent grooming. Novelty was manipulated by means of habituation or not to an open field before the test day. The results showed a rebound effect. The rats submitted to grooming prevention groomed longer after the prevention, independently of the novelty of the open field. Whether this rebound effect is because grooming is necessary to dearousal or just a behavioral marker of this process is discussed.

Keywords: *Grooming*. Prevention. Novelty. Animal models of anxiety.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Comportamento de *crossings* e *rearrings* na caixa de acrílico. A sessão durou 30 min, e as linhas pontilhadas separam os blocos de 15 min, identificados por meio do algarismo junto ao nome do grupo. A retirada dos colares é o marco entre os blocos. O teste post *hoc* apresentou diferença significativa entre ¹ os grupos comparados com eles mesmos no primeiro bloco e ² os grupos do mesmo bloco e colar comparados com aqueles que foram familiarizados à caixa de acrílico. Todos os efeitos significativos estão com $p < 0,05$ 8
- Figura 2** - Comportamento de *grooming* na caixa de acrílico no segundo bloco da sessão. * A ANOVA apontou a prevenção como um fator responsável pela diferença em todas as medidas de *grooming*. Todos os efeitos significativos estão com $p < 0,05$ 9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Experimental	5
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Análise de Variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAIS E MÉTODO	2
2.1	Sujeitos.....	3
2.2	Delineamento Experimental e Procedimento.....	4
2.3	Análise de Dados.....	7
3	RESULTADOS	7
4	DISCUSSÃO	10
	REFERÊNCIAS	15
	APÊNDICE	17
	APÊNDICE A - Dabos Brutos e Resultados das Análises Estatísticas.....	18

INTRODUÇÃO

A prevenção de respostas é um procedimento comportamental relacionado ao bloqueio de uma resposta específica, ou seja, a resposta em questão é impedida de ser realizada por meio de algum aparato adequado (Cordioli, 2014). Foram encontrados poucos artigos que relatam o uso da prevenção em experimentos com animais (McBride & Cuddeford, 2001; McGreevy & Nicol, 1998; Nicol, 1987; Wurbel & Stauffacher, 1996; Wurbel, Freire & Nicol, 1998). Além disso, os principais comportamentos observados foram as mordidas que cavalos dão em pedaços de madeira, o roer de camundongos e alguns comportamentos de galinhas poedeiras. De maneira geral, os objetivos dos trabalhos estavam relacionados ao impacto da prevenção no bem-estar dos animais. Além disso, estes trabalhos não observaram os comportamentos de *grooming*, que é o comportamento foco do presente trabalho. Cabe lembrar que estas ressalvas não são críticas aos trabalhos citados, mas sim evidências da ausência de investigações sobre a prevenção da resposta de *grooming*.

O conceito de efeito rebote é utilizado em várias áreas do conhecimento distintas, contudo no presente trabalho, o uso da expressão efeito rebote se aproxima com o sentido utilizado pela farmacologia. Teixeira (2013) define rebote como a reversão de uma resposta após a retirada de um estímulo e efeito rebote como um aumento da produção de sintomas negativos após ter passado o efeito da droga. Portanto, para o presente trabalho, considera-se como efeito rebote qualquer alteração na frequência das variáveis dependentes observadas após a intervenção, no caso, a prevenção.

O *grooming* é um padrão fixo de ação presente em várias espécies, ocupando uma parte importante no repertório de roedores (Spruijt, van Hooff, Gispen, 1992). Bolles (1960) relata que o *grooming* é a atividade que os ratos gastam mais tempo durante o período de vigília. O *grooming* está relacionado à autolimpeza e outros processos fisiológicos, tais como

a termorregulação, comunicação social e redução de excitação (*dearousal*) (Kalueff et al., 2016).

O *grooming* acontece como um comportamento com função de limpeza, contudo observa-se que este comportamento pode funcionar como uma reação a estímulos inesperados geradores de estresse ou ansiedade (Jolles, Rompa-Barendregt & Gispen, 1979). O *grooming* em situações de baixo estresse ocorre de uma forma espontânea e relaxada envolvendo lambidas das patas até a cauda e os genitais. Contudo, o *grooming* induzido por estresse é etologicamente diferente e ocorre de uma forma rígida e estereotipada, com movimentos rápidos e sequência usualmente demarcada (Kalueff & Tuohimaa, 2004).

O *grooming* estereotipado é caracterizado pelo lambe, pela fricção das patas dianteiras na boca, no nariz, na face, na cabeça e orelhas. Também envolve lambidas no corpo, nos genitais e na cauda, além de coçadas no corpo com as patas traseiras (Kalueff & Tuohimaa, 2005a). Uma sequência de *grooming* usualmente ocorre no sentido cefalocaudal (Kalueff & Tuohimaa, 2005b). Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, (2005) descrevem um padrão estereotipado de *grooming* em quatro fases. Na Fase 1 os movimentos elípticos e simétricos das patas dianteiras se concentram na região do nariz. Na Fase 2 os movimentos das patas podem ocorrer unilateralmente alcançando até as vibrissas. Na Fase 3 as patas realizam movimentos bilaterais por cima da cabeça, passando por cima das orelhas e seguindo em direção ao rosto. E na Fase 4, ocorrem as lambidas no corpo do animal.

A investigação do comportamento de *grooming* e a sua participação no estresse e na ansiedade tem sido estudada de diversas formas, como exemplo: por meio da manipulação do contexto para mais ou menos estressante (van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994); pela comparação de linhagens de animais com diferentes níveis de ansiedade (Estanislau et al., 2013); e pela manipulação farmacológica (Kalueff & Tuohimaa, 2005a).

Van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer (1994) sugerem duas possibilidades para a compreensão do comportamento de *grooming*. O *grooming* como um comportamento necessário para o *dearousal* ou como um mero marcador que indica a mudança para um estado mais calmo. As hipóteses levantadas pelos autores predizem que se o *grooming* fosse necessário para a redução da excitação, haveria uma maior frequência deste comportamento após a exposição a estressores severos do que estressores mais leves. Entretanto, se o *grooming* fosse apenas um marcador comportamental (efeito rebote), se esperaria que este se iniciasse mais tarde após estressores severos do que após estressores leves, uma vez que os animais levariam mais tempo para se acalmar.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a resposta de *grooming* apresenta efeito rebote, interferindo na duração e distribuição regional do *grooming* após a prevenção realizada pelo uso de um colar elisabetano.

2 MATERIAIS E MÉTODO

2.1 Sujeitos

Foram utilizados 46 ratos Wistar, que foram alojados no biotério em número de quatro por gaiola de polipropileno (40 cm x 34 cm x 17 cm). Em cada gaiola, um rato foi destinado aleatoriamente a cada grupo experimental. Os animais foram mantidos em um ciclo claro-escuro de 12/12h (luzes acessas às 7h), a uma temperatura de aproximadamente 23° e com fornecimento de água e alimento à vontade. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Psicobiologia da Universidade Estadual de Londrina. O laboratório está situado no prédio de Psicologia Geral e Análise do Comportamento desta universidade - PGAC - UEL. O

projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (CEUA/UEL, proc. 24250.2015.79).

2.2 Delineamento Experimental e Procedimento

Os ratos foram distribuídos em quatro grupos de acordo com as duas manipulações experimentais: prevenção da resposta de *grooming* e novidade à caixa de acrílico. A prevenção do *grooming* foi manipulada por meio de um colar elisabetano, confeccionado em plástico com aproximadamente três centímetros de largura. Um colar semelhante, mas com apenas 0,5 cm, foi utilizado como controle do colar elisabetano. Para igualar ao máximo as condições entre os grupos em relação à manipulação do animal para colocar o colar elisabetano durante a prevenção e à estimulação tátil que este produzia, foi desenvolvido um colar controle que não impedia os comportamentos de *grooming* rostral e corporal. Assim todos os ratos recebiam manipulações semelhantes, mas com a diferença de ter ou não o *grooming* impedido pelo colar. A novidade foi manipulada por meio do processo de habituação à caixa de acrílico transparente, previamente ao teste. As dimensões desta caixa eram de 30 cm x 30 cm x 30 cm. A caixa de acrílico era uma novidade para os grupos que não foram habituados previamente à mesma.

Dessa forma, os grupos experimentais ficaram organizados da seguinte maneira: *NoPrev-Fam*, com ratos que não passaram pela prevenção de *grooming* e foram previamente habituados a caixa de acrílico; *Prev-Fam*, com ratos que passaram pela prevenção e foram previamente habituados à caixa de acrílico; *NoPrev-Nov*, com ratos que não passaram pela prevenção e tinham a caixa de acrílico como novidade; e *Prev-Nov* com ratos que passaram pela prevenção e tinham a caixa de acrílico como novidade. Os grupos *NoPrev-Fam*, *Prev-*

Fam e *NoPrev-Nov*, contaram com 12 ratos cada. O grupo *Prev-Nov* contou com 10 ratos. A Tabela 1 resume o delineamento experimental.

Tabela 1 – *Delineamento Experimental*

Grupo (n)	Habituação		Dia 2 e 3	Teste		
	Dia 1 30min	30min		Dia 4 5 min	15 min	15 min
NoPrev-Fam (12)	CA	GF + CE	Iguais ao Dia 1	GF+CC	CA+CC	CA
Prev-Fam (12)	CA	GF + CE	Iguais ao Dia 1	GF+CE	CA+CE	CA
NoPrev-Nov (12)	GF	GF + CE	Iguais ao Dia 1	GF+CC	CA+CC	CA
Prev-Nov (10)	GF	GF + CE	Iguais ao Dia 1	GF+CE	CA+CE	CA

Siglas: CA – Caixa de Acrílico; GF – Gaiola Familiar; CC – Colar Controle; CE – Colar Elisabetano.

O experimento durou quatro dias para cada sujeito. O processo de habituação ocorreu três vezes com intervalos de 24h. No quarto dia os ratos eram testados. A cada dia do período de habituação, os ratos dos grupos *NoPrev-Fam* e *Prev-Fam* foram habituados à caixa de acrílico por 30 minutos enquanto os ratos dos grupos *NoPrev-Nov* e *Prev-Nov* ficavam individualmente em gaiolas familiares (GF) por 30 minutos. Estas gaiolas plásticas tinham dimensões de 20 cm x 30 cm x 13 cm e eram utilizadas cada uma com o mesmo rato durante todo o processo de habituação. Em seguida, os ratos de todos os grupos experimentais foram habituados ao colar elisabetano por 30 minutos, individualmente e cada animal em sua respectiva gaiola familiar.

No dia da testagem os ratos permaneciam individualmente em suas gaiolas familiares por cinco minutos, com o respectivo colar do seu grupo experimental. Após este tempo, eram colocados na caixa de acrílico por 15 minutos. Ao final deste bloco, os ratos eram retirados da caixa de acrílico para que os respectivos colares fossem removidos pelo pesquisador, sendo

imediatamente devolvidos a caixa de acrílico, permanecendo por mais 15 minutos. Após o experimento, as caixas de acrílico, os colares elisabetanos e os colares controle eram limpos com uma solução de álcool a 5% e então secos com papel toalha.

Os dois blocos de 15 minutos do dia da testagem foram filmados para posterior observação. Abaixo das caixas de acrílico havia um espelho inclinado que era utilizado para observar o rato de baixo para cima. Isto permitia a visualização dos comportamentos do rato por dois ângulos diferentes na observação dos vídeos das sessões.

O comportamento de *grooming* foi separado em duas categorias para mensuração: *grooming* rostral e *grooming* corporal. O componente rostral compreende movimentos de fricção com as patas dianteiras (incluindo lambidas nessas patas) em direção ao nariz, focinho, cabeça e orelhas. O *grooming* corporal é caracterizado pela limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, área genital e cauda. As coçadas no corpo com as patas traseiras também foram consideradas pertencentes a essa categoria. O *grooming* total é dado pela soma do tempo de *grooming* rostral e corporal e interrupções menores do que cinco segundos. Logo, interrupções maiores do que cinco segundos marcaram a separação de dois episódios. Também foram medidas a frequência das cadeias estereotipadas (*chain*). Uma cadeia estereotipada foi registrada sempre que fricções de 6-7 Hz de pata dianteira com a região oral foram seguidas por uma série curta de movimentos mais lentos dirigidos à cabeça e então por *grooming* corporal.

Para medir os cruzamentos (atividade locomotora), o piso da caixa de acrílico foi dividido em quatro quadrantes e foi contabilizado com que frequência as patas traseiras do rato mudavam de quadrante. As levantadas foram avaliadas por meio da frequência com que o animal ficava sobre as patas traseiras e sua coluna ereta.

2.3 Análise de Dados

Todos os dados foram previamente analisados quanto a sua normalidade e homogeneidade, pelos testes estatísticos Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Ao observar o conjunto dos dados, foi constatado a necessidade de utilizar apenas procedimentos estatísticos paramétricos. Todos os dados brutos e os resultados dos testes estatísticos estão no Apêndice.

Para analisar o efeito da prevenção de *grooming* e da novidade nos comportamentos observados foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de três fatores para medidas repetidas para cada uma das variáveis *crossings* e *rearings*, considerando a prevenção, a novidade e a passagem do tempo, representada pelos dois blocos da sessão.

O efeito da prevenção da resposta de *grooming* só poderia ser observado no segundo bloco da sessão, pois foi no primeiro bloco que a prevenção ocorreu. Ou seja, o rato foi impedido de realizar *grooming* por meio do colar elisabetano. Para cada uma das variáveis relacionadas ao *grooming* (*rostral*, *corporal*, *total* e *cadeias*) foi realizada uma ANOVA de dois fatores, considerando a prevenção e a novidade.

Sempre que a ANOVA indicasse uma diferença significativa, o teste *post hoc* Fisher's LSD foi realizado para encontrar as diferenças entre os grupos. Para todos os casos foi considerado $p < 0,05$ como resultado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

A Figura 1 apresenta as medidas de *crossings* e *rearings* nos dois blocos da sessão. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas mostrou que os *crossings* tiveram efeito da novidade ($F_{[1,42]} = 7,925$; $p < 0,01$), e dos blocos de tempo ($F_{[1,42]} = 84,976$; $p < 0,01$). A

prevenção de grooming não teve efeito significativo. Foi encontrada ainda uma interação entre os fatores novidade e blocos de tempo ($F_{[1,42]} = 12,572$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* indicou diferenças significativas entre todos os grupos em comparação com eles mesmos no segundo bloco, onde nota-se uma diminuição da locomoção no segundo bloco em cada grupo; e também revelou diferença significativa entre *Prev-Fam* e *Prev-Nov*, e entre *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov* no primeiro bloco, havendo mais locomoção nos grupos aos quais a caixa de acrílico era novidade.

O teste de ANOVA para as medidas repetidas de *rearings* revelou efeito significativo do bloco ($F_{[1,42]} = 11,411$; $p < 0,01$) e das interações bloco e novidade ($F_{[1,42]} = 4,307$; $p < 0,05$); e bloco e prevenção ($F_{[1,42]} = 9,468$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* indicou diferença significativa ao comparar os grupos *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov* com eles mesmos no segundo bloco. As medidas apresentaram queda, contudo semelhante queda não foi observada nos grupos submetidos à prevenção de *grooming*. O teste *post hoc* também sinalizou diferença entre *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov*, no qual houve maior número de levantadas em *NoPrev-Nov*.

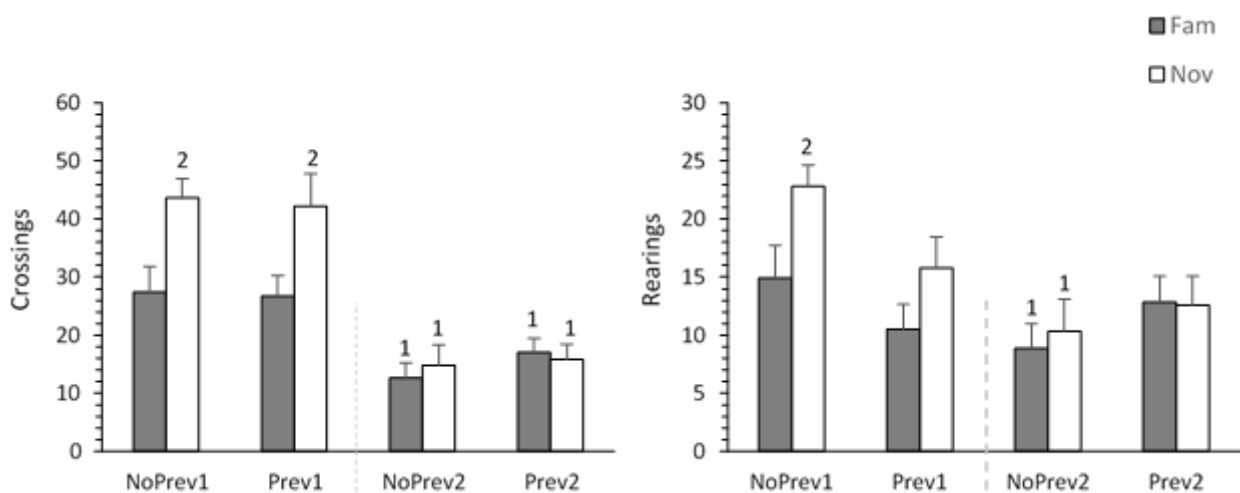


Figura 1 – Comportamento de *crossings* e *rearings* na caixa de acrílico. A sessão durou 30 min, e as linhas pontilhadas separam os blocos de 15 min, identificados por meio do algarismo junto ao nome do grupo. A retirada dos colares é o marco entre os blocos. O teste *post hoc* apresentou diferença significativa entre ¹ os grupos comparados com eles mesmos no primeiro bloco e ² os grupos do mesmo bloco e colar comparados com aqueles que foram familiarizados à caixa de acrílico. Todos os efeitos significativos estão com $p < 0,05$.

A Figura 2 apresenta as medidas de *grooming* do segundo bloco da sessão. As variáveis *Total Grooming*, *Rostral Grooming* e *Corporal Grooming* estão expressas em segundos, enquanto que *Stereotyped Chains* é dada pela frequência das cadeias. A ANOVA de dois fatores indicou efeito significativo apenas da prevenção, observando que todas as respostas de *grooming* analisadas foram maiores quando comparadas com os grupos *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov*. A ANOVA não apontou efeito da novidade e tampouco da interação entre os fatores. Os respectivos resultados das ANOVA's foram: *Total Grooming* ($F_{[1,42]} = 6,987$; $p < 0,01$), *Rostral Grooming* ($F_{[1,42]} = 4,863$; $p < 0,05$), *Corporal Grooming* ($F_{[1,42]} = 6,806$; $p < 0,01$) e *Stereotyped Chains* ($F_{[1,42]} = 8,986$; $p < 0,01$).

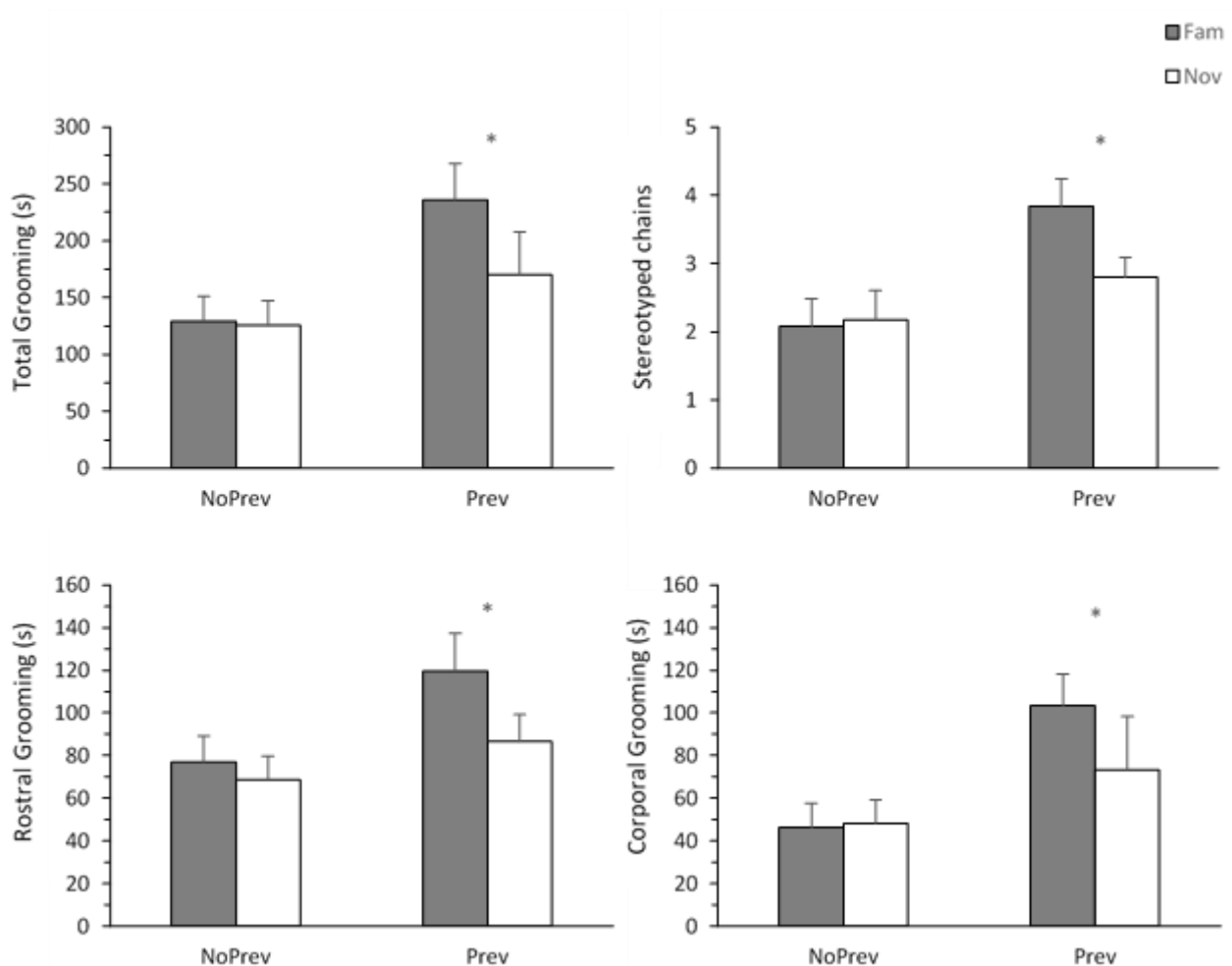


Figura 2 – Comportamento de *grooming* na caixa de acrílico no segundo bloco da sessão. * A ANOVA apontou a prevenção como um fator responsável pela diferença em todas as medidas de *grooming*. Todos os efeitos significativos estão com $p < 0,05$.

As médias (\pm E.P.M.) de todas as variáveis estudadas e os resultados dos testes estatísticos realizados estão expostas no Apêndice.

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo verificar se a prevenção da resposta de *grooming* produziria um efeito rebote, aumentando a sua ocorrência logo após o período de prevenção. Procurou-se observar se haveria um efeito rebote compensatório. Para tanto, foram criados quatro grupos experimentais: *NoPrev-Fam*, *Prev-Fam*, *NoPrev-Nov*, *Prev-Nov*. Os grupos se diferenciavam de acordo com a sua história em relação às variáveis manipuladas: a prevenção da resposta de *grooming* por meio do colar elisabetano e a novidade manipulada por meio do processo de habituação à caixa de acrílico previamente ao teste.

Nota-se nas medidas de *crossings* um efeito da novidade à caixa de acrílico durante o primeiro bloco. Observa-se também que a locomoção diminuiu no segundo bloco, indicando habituação ao ambiente. Ou seja, a caixa de acrílico era uma novidade para os grupos *NoPrev-Nov* e *Prev-Nov*, o que fica evidente no primeiro bloco, mas deixa de ser novidade no segundo bloco, pois não há diferença entre os grupos, sugerindo habituação dos animais. O uso dos aparatos relacionados à prevenção do *grooming*, os colares elisabetanos e os colares controle, não influíram nas medidas de *crossings*.

As medidas de *rearings* foram semelhantes às medidas de *crossings*, porém com efeitos menos evidentes. Nota-se que a novidade teve efeito no primeiro bloco apenas entre os grupos que não passaram pela prevenção, *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov*. O feito do bloco também ocorreu apenas em *NoPrev-Fam* e *NoPrev-Nov* em comparação com eles mesmos no outro bloco, mas não nos animais submetidos à prevenção de *grooming*. Isto pode ter ocorrido em função do uso do colar elisabetano pelos animais dos grupos *Prev-Fam* e *Prev-Nov*, que

parece ter prejudicado em algum grau a realização de *rearings*. Contudo, também é possível observar a habituação dos animais no segundo bloco por meio das medidas de *rearings*, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e os valores foram baixos.

Como pode ser observado, as medidas de *rearings* e *crossings* do presente trabalho indicam habituação dos animais no segundo bloco. Archer (1993) ao revisar o papel de vários comportamentos na emoção aponta que é comum observar uma redução nas medidas de *rearing* e locomoção após algum tempo em um ambiente novo, indicando habituação dos animais a este ambiente.

Observa-se que as diferenças estatisticamente significativas nas medidas de *grooming* apontaram para o mesmo efeito em todas elas. Uma ANOVA foi realizada para cada medida e todas indicaram a prevenção da resposta de *grooming* como fator de influência nas medidas e não revelaram nenhuma interação entre os fatores. Portanto, é possível afirmar que a prevenção realizada no primeiro bloco foi responsável pelo aumento das respostas de *grooming* no segundo bloco. Não foi revelado pelas análises estatísticas efeito da novidade nas respostas de *grooming* no segundo bloco, aparentemente devido à habituação dos animais à caixa de acrílico, o que é corroborado pelas respostas exploratórias exibidas no segundo bloco.

Fica evidente o efeito rebote nas respostas de *grooming* rostral, corporal e nas cadeias estereotipadas, pois é possível notar que, ao comparar os respectivos grupos os quais a única diferença foi o processo de prevenção (*NoPrev-Fam* com *Prev-Fam* e *NoPrev-Nov* com *Prev-Nov*), as repostas de *grooming* foram maiores.

Embora a relação entre *grooming* e estresse/ansiedade esteja bem estabelecida na literatura (Estanislau et al., 2013; Jolles, Rompa-Barendregt & Gispen, 1979; Kalueff & Tuohimaa, 2005a; Veloso, Filgueiras, Lorenzo, Estanislau, 2016), as hipóteses levantadas por

van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer (1994) sobre o *grooming* ser necessário para o *dearousal* ou ser apenas um marcador que indica um estado de *dearousal* no animal ainda necessitam de explicação. Estas hipóteses levariam a duas previsões. Se o *grooming* fosse necessário para a redução da excitação no animal após a exposição a um estressor, se esperaria que estressores severos fossem imediatamente seguidos por mais *grooming* do que estressores mais leves. Contudo, se o *grooming* fosse apenas um marcador comportamental indicando mudança para um estado mais tranquilo (ou um rebote de uma atividade adiada que não é necessária para acalmar o animal), se esperaria que o *grooming* após estressores severos fosse atrasado (se iniciaria mais tarde), uma vez que os animais levariam mais tempo para se acalmar. Os autores observaram naquele estudo que as respostas de *grooming* eram inibidas diante da presença dos estressores utilizados no experimento e tinham o seu pico mais atrasado em comparação a estressores mais severos.

Spruijt, van Hooff & Gispen (1992) comentam que a observação do comportamento de *grooming* coincide mais com o período após a excitação, refletindo o processo de *dearousal* devido ao fim ou habituação à situação estressante. Todavia não apresentam informações que ajudam no esclarecimento das hipóteses levantadas por van Erp et al. (1994).

Os dados do presente trabalho também não elucidam a questão. Embora fique claro o efeito rebote nas medidas de *grooming*, não é possível dizer se este excedente foi devido a uma compensação por não ter podido realizar o *grooming* ou devido ao efeito estressante da prevenção em si.

Os trabalhos mencionados anteriormente, que investigam os efeitos da prevenção em animais também não contribuem para a compreensão da noção de que as respostas estereotipadas são necessárias para o enfrentamento da situação estressora/ansiosgênica ou acontecem durante o enfrentamento. Nicol (1987) analisou vários comportamentos de

galinhas poedeiras e realizou a prevenção destas respostas por meio da gaiola viveiro. Alguns animais ficaram individualmente em gaiolas pequenas que restringiam os movimentos das galinhas e outros ficaram em gaiolas maiores. A autora observou efeito rebote em apenas alguns destes comportamentos, tais como bater as asas, abanar a cauda, alongar as asas e alongar as patas. Wurbel & Stauffacher (1996) e Wurbel, Freire & Nicol (1998) investigaram o comportamento de roer (*wire-gnawing*) as grades da gaiola em camundongos. A prevenção foi realizada pela redução do espaço entre as grades. Em ambos os trabalhos não foi encontrado efeito rebote após a prevenção das respostas. McGreevy & Nicol (1998) e McBride & Cuddeford (2001) investigaram em cavalos o comportamento de morder (*crib-biting*) barras de madeira do estábulo. Realizaram a prevenção deste comportamento por meio de um colar que os impedia de morder. Ambos encontraram efeito rebote nas respostas de morder as barras. Pode-se observar que não há concordância entre estes trabalhos em vários aspectos. Os comportamentos observados foram diversos e em diferentes animais; houve discrepância na observação do efeito rebote; não estão de acordo sobre o quão estressante é o processo de prevenção para os animais; também não há concordância ao considerar os comportamentos estereotipados como *coping* para as situações aversivas. Contudo, parecem compartilhar a noção de que as diferenças encontradas se devem as diferenças nos padrões de motivação e regulação de cada resposta.

Nota-se que o papel do *grooming* em situações ansiogênicas e estressantes está claro na literatura. Também é evidente a importância da observação do *grooming* por longos períodos de tempo, pois os primeiros minutos não são suficientes para mostrar as evidências dos efeitos dos estímulos aversivos no *grooming*. Porém a discussão sobre a necessidade dos comportamentos estereotipados no enfrentamento ou se estes comportamentos são meros marcadores ainda precisa ser esclarecida.

Este conhecimento será importante para compreender o *grooming* e suas facetas e também para a condução de pesquisas que investiguem os efeitos da prevenção de respostas estereotipadas em seres humanos.

REFERÊNCIAS

- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., Zhuang, X. (2005). Sequential superstereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*, 3(4).
- Bolles, R. C. (1960). Grooming behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53, 306–310.
- Cordioli, A. V. (2014). A Terapia de Exposição e Prevenção de resposta: Histórico, fundamentos e técnicas. In Cordioli, A. V. (org). *TOC: Manual de Terapia Cognitivo-Comportamental para o Transtorno Obsessivo-compulsivo* (2. ed.). Porto Alegre: Artmed.
- 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, 187-201.
- Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., Gispen, W. (1979). Novelty and Grooming Behavior in the Rat. *Behavioral and Neural Biology*, 25, 563-572.
- Kalueff, A., Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13, 151-158.
- Kalueff, A., Stewart, A.M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., Fentress, J. C. (2016) Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17, 45-59.
- 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 Affect the Characteristics of Grooming Behavior in Rats? *International Journal of Comparative Psychology*, 16, 237-246.
- McBride, S. D., Cuddeford, D. (2001). The Putative Welfare-Reducing Effects of Preventing Equine Stereotypic Behaviour. *Animal Welfare*, 10, 173-189.
- McGreevy, P. D., Nicol, C. J. (1998). The effect of short term prevention on the subsequent rate of crib-biting in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 27(suppl), 30-34.
- Nicol, C. J. (1987). Behavioural responses of laying hens following a period of spatial restriction. *Animal behaviour*, 35 (6), 1709-1719.

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

Teixeira, M. Z. (2013). Rebound effects of modern drugs: serious adverse events unknown by health professionals. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 59(6), 629-638.

van Erp, A. M., Kruk, M., Meelis, W., Willekens-Bramer, D. (1994). Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*, 65(1), 47-55.

Veloso, A. W. N., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., Estanislau, C. (2016). Modulation of Grooming Behavior in Rats by Different Test Situations. *Psychology & Neuroscience*, 9 (1), 91-104.

Wurbel, H., Freire R., Nicol, C. J. (1998) Prevention of stereotypic wire-gnawing in laboratory mice: Effects on behaviour and implications for stereotypy as a coping response. *Behavioural Processes*, 42 (1), 61-72.

Wurbel, H. & Stauffacher, M. (1996). Prevention of Stereotypy in Laboratory Mice: Effects on Stress Physiology and Behaviour. *Physiology & Behaviour*, 59 (6), 1163 - 1170.

APÊNDICE

APÊNDICE A
Dabos Brutos e Resultados das Análises Estatísticas.

Crossings

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
27	4	42	25	63	13	61	18
19	6	9	13	37	19	75	9
20	18	27	9	42	3	50	7
26	16	25	21	32	27	42	14
17	4	20	16	46	13	20	10
21	5	22	5	32	2	43	18
10	7	15	13	36	7	29	10
37	11	8	29	55	1	51	36
22	6	42	5	28	1	20	19
21	19	38	23	54	37	31	17
41	22	37	15	42	24		
68	33	36	30	57	30		

Rearings

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
13	1	7	13	28	9	20	18
7	2	3	6	23	5	33	11
7	21	13	9	21	1	19	4
13	7	11	11	12	15	25	8
4	2	4	13	21	14	9	5
14	5	14	6	23	1	10	12
8	7	6	10	14	6	8	6
26	10	0	26	26	0	13	28
11	3	8	3	22	2	12	22
14	14	27	26	21	21	9	12
24	10	18	9	28	21		
38	24	15	22	35	29		

Total Grooming (s)

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
238,746	39,054	53,313	97,967	265,111	136,018	77,192	198,722
102,533	150,411	28,731	344,757	132,39	85,822	24,892	185,996
178,316	107,894	27,376	162,047	284,298	42,182	99,297	93,265
282,015	237,039	87,188	363,552	25,405	168,617	114,469	186,116
416,831	203,481	63,288	291,473	36,402	174,11	28,84	60,392
120,966	228,786	2,5	378,725	303,542	207,715	12,199	410,069
113,401	67,104	11,877	152,72	348,585	157,817	13,721	118,589
414,371	13,672	2,193	160,366	333,39	0	19,065	323,285
349,819	195,227	9,761	33,709	336,327	118,651	20,786	56,534
535,629	134,75	19,432	284,91	354,168	47,066	11,479	67,676
571,892	63,414	91,759	310,897	373,846	264,654		
361,633	110,501	220,933	245,587	208,182	108,056		

Rostral Grooming (s)

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
172,65	17,925	40,391	49,249	213,369	61,597	50,321	96,363
88,536	101,463	22,351	162,695	94,386	68,862	14,288	104,792
145,916	68,374	16,592	54,566	227,622	42,182	56,045	46,627
214,677	122,369	69,994	161,024	17,13	95,1	70,545	122,665
353,62	148,486	35,848	138,083	27,719	73,457	19,581	40,638
98,001	121,826	2,5	230,521	237,422	128,267	11,718	134,167
96,435	62,23	4,363	85,84	265,118	62,799	13,606	95,143
308,237	13,672	2,193	79,768	264,181	0	12,716	138,21
237,57	67,104	6,247	31,837	254,918	51,459	14,915	37,799
404,757	87,182	16,924	109,053	303,214	23,848	0,878	49,259
369,532	30,523	57,541	172,149	321,273	132,125		
252,639	81,951	126,943	162,211	175,166	84,121		

Corporal Grooming (s)

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
31,336	19,98	0	47,261	23,125	69,525	0	95,162
0	43,472	0	153,036	0,391	9,509	0	77,379
0,38	25,868	0	105,089	16,934	0	0	43,911
33,57	98,145	0	179,785	0	56,203	0	52,167
11,721	44,233	0	132,789	0,585	91,798	0	11,129
11,409	99,316	0	128,843	29,209	68,992	0	250,288
0	1,688	0	65,004	37,583	87,712	0	16,334
55,314	0	0	67,564	32,095	0	0	164,72
28,868	120,219	0	0	6,726	53,948	0	11,113
85,954	52,03	0	155,521	11,166	21,565	0	10,748
122,641	29,013	0	111,267	7,155	105,627		
48,857	20,475	0	92,873	5,052	15,045		

Total Chains

NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
3	1	0	2	2	3	0	4
0	3	0	6	0	2	0	4
1	3	0	4	1	1	0	2
4	2	0	4	1	4	0	3
3	3	0	5	2	5	0	2
2	5	0	5	4	1	0	4
0	1	0	4	6	1	0	2
2	0	0	3	3	0	0	3
3	3	0	1	4	2	0	2
6	2	0	3	4	1	0	2
6	1	0	5	4	4		
1	1	0	4	3	2		

TESTE DE NORMALIDADE SHAPIRO-WILK

	NoPrevFam1	NoPrevFam2	PrevFam1	PreFam2	NoPrevNov1	NoPrevNov2	PrevNov1	PrevNov2
Crossings	0,011	0,0561	0,2777	0,5425	0,5269	0,2211	0,6964	0,0331
Rearings	0,0513	0,0847	0,7468	0,0708	0,6078	0,1722	0,0867	0,2832
Total Grooming					0,0303	0,999	0,0051	0,0992
Rostral Grooming					0,0841	0,9141	0,0205	0,1155
Corporal Grooming					0,1256	0,2429	0,0001	0,0196
Total Chains					0,6557	0,2541	0,0001	0,0042

*p < 0,05 indica distribuição não normal

TESTE DE HOMOGENEIDADE LEVENE

Dados Primeiro Bloco

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Crossings	Based on Mean	,555	3	42	,648
	Based on Median	,545	3	42	,655
	Based on Median and with adjusted df	,545	3	29,460	,656
	Based on trimmed mean	,583	3	42	,630
Rearings	Based on Mean	,805	3	42	,498
	Based on Median	,362	3	42	,781
	Based on Median and with adjusted df	,362	3	34,704	,781
	Based on trimmed mean	,608	3	42	,614

Dados Segundo Bloco

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Crossings	Based on Mean	1,704	3	42	,181
	Based on Median	1,154	3	42	,338
	Based on Median and with adjusted df	1,154	3	39,687	,339
	Based on trimmed mean	1,579	3	42	,209
Rearings	Based on Mean	,649	3	42	,588
	Based on Median	,485	3	42	,694
	Based on Median and with adjusted df	,485	3	41,500	,694
	Based on trimmed mean	,612	3	42	,611
Total Grooming	Based on Mean	1,578	3	42	,209
	Based on Median	1,273	3	42	,296
	Based on Median and with adjusted df	1,273	3	33,771	,299
	Based on trimmed mean	1,521	3	42	,223
Rostral Grooming	Based on Mean	2,060	3	42	,120
	Based on Median	1,942	3	42	,138
	Based on Median and with adjusted df	1,942	3	40,540	,138
	Based on trimmed mean	2,058	3	42	,120
Corporal Grooming	Based on Mean	1,832	3	42	,156
	Based on Median	1,039	3	42	,385
	Based on Median and with adjusted df	1,039	3	22,035	,395
	Based on trimmed mean	1,601	3	42	,204
Total Chains	Based on Mean	,595	3	42	,622
	Based on Median	,388	3	42	,762
	Based on Median and with adjusted df	,388	3	36,688	,762
	Based on trimmed mean	,540	3	42	,658

ANOVA de três fatores para medidas repetidas

Crossings	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	57238,13	1	57238,13	297,5771	0,000000
Prevenção	15,87	1	15,87	0,0825	0,775320
Novidade	1524,44	1	1524,44	7,9255	0,007390
Prevenção*Novidade	24,80	1	24,80	0,1289	0,721331
Error	8078,58	42	192,35		
Bloco	9120,01	1	9120,01	84,9763	0,000000
Bloco*Prevenção	82,51	1	82,51	0,7688	0,385567
Bloco*Novidade	1349,34	1	1349,34	12,5726	0,000977
Bloco*Prevenção*Novidade	9,41	1	9,41	0,0877	0,768596
Error	4507,62	42	107,32		

Rearings	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	16864,03	1	16864,03	198,9302	0,000000
Prevenção	38,38	1	38,38	0,4528	0,504717
Novidade	299,67	1	299,67	3,5349	0,067037
Prevenção *Novidade	27,03	1	27,03	0,3189	0,575289
Error	3560,49	42	84,77		
Bloco	540,43	1	540,43	11,4113	0,001584
Bloco*Prevenção	448,40	1	448,40	9,4680	0,003673
Bloco*Novidade	204,00	1	204,00	4,3076	0,044104
Bloco*Prevenção*Novidade	1,11	1	1,11	0,0235	0,878804
Error	1989,09	42	47,36		

Post Hoc LSD

LSD test; variable DV_1 (Dados Gerais - ANOVA)

Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 149,84, df = 77,742

Crossings

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
	26,75	17	42,2	15,8	27,417	12,583	43,667	14,75
1 PrevFam1								
2 PrevFam2	0,026158							
3 PrevNov1	0,012756							
4 PrevNov2		0,840832	0,000001					
5 NoPrevFam1	0,906831							
6 NoPrevFam2		0,439730			0,001093			
7 NoPrevNov1			0,806124		0,006401			
8 NoPrevNov2				0,860502		0,703894	0,000000	

LSD test; variable DV_1 (Dados Gerais - ANOVA)

Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between; Within; Pooled MS = 66,066, df = 77,765

Rearrings

Tratamento	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
	10,5	12,833	15,8	12,6	14,917	8,8333	22,833	10,333
1 PrevFam1								
2 PrevFam2	0,410942							
3 PrevNov1	0,186039							
4 PrevNov2		0,953084	0,304401					
5 NoPrevFam1	0,246611							
6 NoPrevFam2		0,293338			0,036095			
7 NoPrevNov1			0,081639		0,041209			
8 NoPrevNov2				0,568387		0,691872	0,000062	

ANOVA de dois fatores

Total Grooming	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	1247566	1	1247566	134,7926	0,000000
Prevenção	64675	1	64675	6,9878	0,011487
Novidade	13556	1	13556	1,4646	0,232965
Prevenção*Novidade	11022	1	11022	1,1908	0,281384
Error	388729	42	9255		

Rostral Grooming	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	353795,8	1	353795,8	163,2421	0,000000
Prevenção	10540,7	1	10540,7	4,8635	0,032958
Novidade	4910,6	1	4910,6	2,2658	0,139745
Prevenção*Novidade	1772,8	1	1772,8	0,8180	0,370933
Error	91026,9	42	2167,3		

Corporal Grooming	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	209952,3	1	209952,3	74,35445	0,000000
Prevenção	19219,6	1	19219,6	6,80662	0,012528
Novidade	2213,5	1	2213,5	0,78391	0,380990
Prevenção*Novidade	2940,6	1	2940,6	1,04141	0,313336
Error	118594,0	42	2823,7		

Total Chains	SS	Degr. Of Freedom	MS	F	p
Intercept	338,4198	1	338,4198	187,3913	0,000000
Prevenção	16,2294	1	16,2294	8,9866	0,004554
Novidade	2,5786	1	2,5786	1,4278	0,238825
Prevenção*Novidade	3,5627	1	3,5627	1,9728	0,167509
Error	75,8500	42	1,8060		