



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THIAGO SOARES CAMPOLI

**PAPEL DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE SOBRE O  
COMPORTAMENTO DE *GROOMING* INDUZIDO POR  
NOVIDADE EM RATOS**

---

Londrina  
2019

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

Campoli, Thiago Soares.

Papel do núcleo dorsal da rafe sobre o comportamento de grooming induzido por novidade em ratos / Thiago Soares Campoli. - Londrina, 2019.

ix, 32 f.

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, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Grooming - Tese. 2. Ansiedade - Tese. 3. Núcleo Dorsal da Rafe - Tese. 4. ICampo Aberto - Tese. I. Estanislau, Celio Roberto. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. IV. Título.

THIAGO SOARES CAMPOLI

**PAPEL DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE SOBRE O  
COMPORTAMENTO DE *GROOMING* INDUZIDO POR  
NOVIDADE EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre junto ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento.

Área de concentração: Análise do Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Célio Estanislau

Londrina  
2019

THIAGO SOARES CAMPOL

**PAPEL DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE SOBRE O  
COMPORTAMENTO DE *GROOMING* INDUZIDO POR NOVIDADE  
EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em  
Análise do Comportamento  
Área de concentração: Análise do Comportamento

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de março de 2019.

*Dedico este trabalho para  
meu pai, minha mãe e meu irmão*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer todo suporte dos meus pais, Ademir Kenide Campoli e Katia Eliana Soares Campoli, na realização deste trabalho. Vocês são a base que tenho em minha vida e para vocês que dedico este trabalho.

Quero agradecer em especial ao meu irmão, Matheus Soares Campoli, que apesar de longe, tem me apoiado e ajudado em minhas decisões. Obrigado por tudo, Matheus!

Quero agradecer aos laboratórios e professores de outros departamentos que me acompanharam nessa pesquisa: Viviane, professora Gislaine, professor Norberto Cairasco e professora Marli. O conhecimento de vocês possibilitou a realização desse projeto. Muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam nessa jornada: Marina Zani, Rodrigo Klein, Sebastião Santos, Mayron Picollo, Kiko, Luiz Cicotte, Larissa Schafranski, Christiane Henriques, Vinícius Camargo, Andresa Bibiano, Gabriel Bertelli, Acauã Galdino, Mayron Piccolo, Nathalia Hitomi, Myenne Mieko, Thais Peron, Fabio Trucillo, Lucas Pozzobom, Vinicius Daniel, Antônio Neto, Maurício Tavares, Nathalia Alves, Isabela Dutra, Vitor Furlaneto, Rhaissa Carraro, Alan Ribeiro e Ana Elisa Volpato. Vocês são tudo que eu tenho. Muito obrigado por tudo!

E por fim, gostaria de agradecer ao professor Guilherme Filgueiras, por me ensinar a ser um pesquisador e criar em mim um pensamento crítico, e ao meu orientador, Célio Estanislau, por tornar o pesquisador e cientista que sou hoje. Muito obrigado, professores, por toda paciência, dedicação e confiança depositados em mim!

Campoli, T. S. **Papel do núcleo dorsal da rafe sobre o comportamento de *grooming* induzido por novidade em ratos.** 2019. 32 f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O *grooming* (autolimpeza) é um comportamento complexo que pode ser observado em roedores, em diferentes contextos e pode ser útil em pesquisas translacionais para o estudo de transtorno psiquiátricos. O objetivo do presente estudo foi investigar a participação do núcleo dorsal da rafe (NDR) na modulação do comportamento de *grooming* em resposta à novidade (um campo aberto de acrílico). Para tanto, foi administrado diferentes concentrações de muscimol e bicuculina, agonista e antagonista, respectivamente, de receptores GABA<sub>A</sub>, no NDR. Quarenta e um ratos Wistar foram submetidos à cirurgia estereotáxica para atingir o NDR e ficaram em gaiolas de polipropileno por 7 dias. Depois do período de recuperação, os ratos foram separados em grupos, submetidos a microinjeções muscimol (50 ng/0,1µl ou 25ng/0,1µl) e bicuculina (30 ng/0,1µl ou 15 ng/0,1µl). A seguir, cada animal foi individualmente testado em um campo aberto para avaliação comportamental. Os testes estatísticos demonstraram que as concentrações utilizadas para inibição e desinibição das vias no NDR provocaram efeito no *grooming* rostral e não influenciaram no padrão sequencial desse comportamento. Foi observada tendência estatística em total de transições, tempo total e total de cadeias de *grooming*. Esses resultados são importantes, pois em parte condizem com a literatura e trazem também novos resultados para investigação da relação entre ansiedade induzida pela novidade e o NDR. Além disso, o presente estudo pode servir de base para estudos posteriores que pretendem investigar outros comportamentos com relação ao núcleo dorsal da rafe.

**Palavras-chave:** Ansiedade. Núcleo dorsal da rafe. Grooming. Muscimol. Bicuculina. Campo aberto.

Campoli, T. S. **Role of dorsal raphe nucleus on novelty-induced self-grooming behavior in rats.** 2019. 32 p. Dissertation (Master's Degree in Behavior Analysis) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

### ABSTRACT

Self-grooming is a complex behavior that can be observed in rodents repertoire in different contexts and can be useful in translational research for the study of psychiatric disorders. The objective of the present study was to investigate the participation of dorsal raphe nucleus (DRN) in the modulation of novelty induced (Plexiglas open field) grooming behavior. The nucleus was submitted to microinjections of different concentrations of muscimol and bicuculin, agonist and antagonist, respectively, of GABA<sub>A</sub> receptors. Forty one Wistar rats underwent stereotaxic surgery to reach the DRN and afterwards remained in polypropylene cages for 7 days. After the recovery period, the rats were separated into groups, subjected to microinjections of muscimol (50ng / 0.1µl or 25ng / 0.1µl) and bicuculline (30ng / 0.1µl or 15 ng / 0.1 µl). Each animal was then individually tested in an open field for behavioral evaluation. Statistical tests showed that the concentrations used for DRN inhibition and disinhibition demonstrated an effect on rostral grooming and did not influence the sequential patterning of this behavior. There was also a statistical tendency in total transitions, total time and total chains of grooming. These results are important because they are in part consistent with the literature and also bring new results to investigate the relationship between novelty-induced anxiety and the DRN. In addition, the present study may serve as a basis for further studies that seek to investigate other behaviors with respect to the dorsal raphe nucleus.

**Keywords:** Anxiety. Dorsal raphe nucleus. Grooming. Muscimol. Bicuculline. Open field.

**LISTA DE FIGURAS**

<i>Figura 1.</i>	Vias serotonérgicas do NDR em ratos .....	4
<i>Figura 2.</i>	Modelo simplificado do duplo papel da serotonina .....	5
<i>Figura 3.</i>	Resultados dos comportamentos de atividade .....	11
<i>Figura 4.</i>	Resultados do comportamentos defensivos e ansiedade .....	12
<i>Figura 5.</i>	Resultados da duração do comportamento de <i>grooming</i> .....	13
<i>Figura 6.</i>	Resultados relativos a outras medidas de <i>grooming</i> .....	14

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DRN	<i>Dorsal Nucleus of Raphe</i>
GABA	Ácido gama aminobutírico
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
SCP	Substância cinzenta periaquedutal

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	6
<b>Objetivo Geral</b> .....	6
<b>Objetivos Específicos</b> .....	6
<b>METODOLOGIA</b> .....	7
<b>Sujeitos</b> .....	7
<b>Implante de cânula-guia no núcleo dorsal da rafe</b> .....	7
<b>Microinjeção de drogas</b> .....	8
<b>Teste do campo aberto</b> .....	8
<b>Histologia</b> .....	10
<b>Análises de dados</b> .....	10
<b>RESULTADOS</b> .....	11
<b>DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>APÊNDICE</b> .....	28

A ansiedade é um estado psicológico, fisiológico e comportamental que pode ser induzido pela ameaça potencial à sobrevivência, sendo a sua função preparar para o enfrentamento de uma situação perigosa ou inesperada. Geralmente, é caracterizada pelo aumento de *arousal* (excitação), ativação neuroendócrina e autonômica e padrões específicos comportamentais, frequentemente com a passagem de outros comportamentos (e.g. exploratórios) para comportamentos defensivos (Steimer, 2011). Tanto em humanos quanto em animais não-humanos, a ansiedade é uma emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco. Esse comportamento pode ser apresentado em ambientes que o perigo é incerto. Por exemplo, expor um animal a um ambiente novo é uma maneira de provocar comportamentos de avaliação de risco. Em situações como essa há um conflito entre aproximação e evitação (Blanchard & Blanchard, 1988).

A ansiedade desencadeia diversas reações fisiológicas e psicológicas no organismo. Podemos observar taquicardia, aumento da pressão arterial, irritabilidade, dificuldade em controlar sentimentos de preocupação e aumento de glicocorticoides são algumas características da ansiedade. A persistência de um estado de ansiedade pode ser desadaptativa e constituir uma patologia, incapacitando o indivíduo de responder de maneira adequada ao ambiente (APA, 2013; Corr, 2006; Steimer, 2011). A estimativa é de que 19,1% da população americana tiveram algum transtorno de ansiedade no ano de 2007 e, ao longo da vida, 31,1% dos adultos já experienciaram algum transtorno de ansiedade. No Brasil, a prevalência desse transtorno na população é de 9,3% (Kessler, Chiu, Demler, & Walters, 2005; Kessler et al., 2015; World Health Organization, 2017).

Curiosamente, a ansiedade, além de ser o elemento principal de todo um grupo de transtornos, em outros transtornos constitui sintoma coadjuvante. Em partes desses transtornos, a ansiedade é reportada como ‘gatilho’ para o exercício de compulsões. Por exemplo, podemos observar comportamentos ritualizados em resposta a estados de ansiedade (APA, 2013; Boyer & Liénard, 2006). Dessa forma, a regulação de padrões motores pela ansiedade é um tema que merece ser explorado.

Uma forma promissora de entendermos melhor sobre ansiedade é com a utilização de modelos animais. Os modelos animais visam replicar características comportamentais, fisiológicas e farmacológicas em espécie não-humana. No caso da ansiedade, a ameaça pode ser proporcionada por meio de punição, incerteza ou novidade do ambiente, sendo possível observar e medir as respostas comportamentais e fisiológicas nessas situações ansiogênicas (Steimer, 2011).

Comportamentos que ocorrem naturalmente com padrões previsíveis são úteis no entendimento de princípios organizacionais e motivacionais que os influenciam. O *grooming* é um exemplo desses comportamentos, pois é previsível que ocorra em ambientes novos, está presente no repertório de várias espécies e é útil para esclarecimento de circuitos neurais que regulam a sequência do comportamento motor (Kalueff et al., 2015; Komorowska & Pellis, 2004).

O *grooming* é um comportamento com movimentos altamente estereotipados, repetitivos, perseverantes e é uma das principais atividades que os ratos realizam acordados. Sua função parece estar relacionada com o cuidado do pêlo, mas experiências estressoras podem induzi-lo ou exacerbá-lo (Berridge, Fentress, & Parr, 1987; Berridge & Whishaw, 1992; Bolles, 1960; Maio, Filgueiras, Cunha, & Estanislau, 2014). Há investigações que relacionam a resposta de *grooming* com a perda de calor e controle de temperatura (Adolph, 1947; Hainsworth, 1967), situações de conflito (Van Iersel & Angela Bol, 1958) novidade ou outros estressores (van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994), ansiedade (Kalueff & Tuohimaa, 2004), o período pós-contato social e comportamento sexual (Spruijt, Van Hooff, & Gispen, 1992).

O *grooming* é estudado relacionado com o contexto em que ele ocorre. A apresentação desse comportamento pode ser influenciada por diferentes ambientes e é sensível aos níveis de estresse (Kalueff & Tuohimaa, 2004; Komorowska & Pisula, 2003; Veloso, Filgueiras, Lorenzo, & Estanislau, 2016). Por exemplo, Jolles, Rompa-Barendregt e Gispen (1979) demonstraram que a exposição à novidade aumenta a frequência de *grooming* em ratos em campo aberto. Além da influência ambiental, o *grooming* parece estar relacionado com uma função “desestressora” (*desarousal*) do estado de ansiedade, observando-se uma maior frequência desse comportamento em ambientes novos (Spruijt et al., 1992).

O *grooming* pode fornecer um modelo de comportamento repetitivo, auto direcionado e com padrões sequenciais. Os avanços em estudos de mecanismos cerebrais demonstram que o aspecto sequencial desse comportamento pode estar relacionado a funções cerebrais específicas. Por exemplo, é possível observar uma progressão cefalocaudal do comportamento de *grooming* nos roedores, como lambe as patas, esfregar o nariz e rosto, limpar a cabeça e lambe o corpo. O controle desse comportamento tem a participação de algumas estruturas cerebrais, como córtex orbitofrontal, dorsolateral, corpo estriado e mesencéfalo. Os movimentos realizados no *grooming* são tradicionalmente estudados, contudo, insuficientes para análise e interpretação completa dos dados. O padrão sequencial do *grooming*,

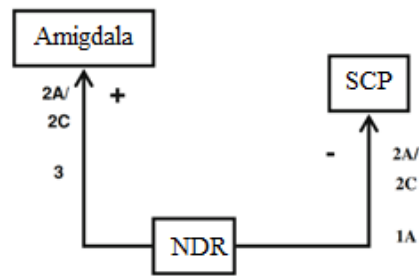
representado em alguns estudos pela porcentagem de transições incorretas, que é a avaliação da transição de uma fase para outra do *grooming* de forma não-cefalocaudal, e a porcentagem de episódios interrompidos são parâmetros mais recentes adotados para avaliação desse comportamento (Berridge et al., 1987; Berridge & Whishaw, 1992; A. V. Kalueff, 2003; A. V. Kalueff & Tuohimaa, 2004). Logo, por meio desses parâmetros é possível entender melhor os aspectos motores e sequenciais desse comportamento.

O estudo sobre o comportamento de *grooming* é útil nas pesquisas neurocientíficas translacionais. Apesar de não ser considerado um modelo exato de patologia humana, esse comportamento oferece um valor mais amplo de modelo de comportamentos repetitivos, estereotipados e com um padrão sequencial, o que pode ser interessante para vários fenômenos comportamentais relevantes de distúrbios cerebrais. Portanto, estudar o *grooming* traz a possibilidade de estudarmos mecanismos neurais hierárquicos do controle motor sobre esse comportamento e fornecer informações sobre suas desregulações. Tais análises evidenciam o quanto o *grooming* é sensível a fatores genéticos, farmacológicos, fisiológicos e contextuais (Kalueff et al., 2016).

Existem estudos que investigaram a relação entre estruturas neuroanatômicas e o *grooming*. A decerebração do mesencéfalo, por exemplo, demonstrou um padrão sequencial de cadeias de *grooming* normal em ratos, porém, tais animais tiveram dificuldades em executar o padrão completo. Entretanto, em áreas cerebrais mais caudais, como metencéfalo e mielencéfalo, a decerebração prejudicou o padrão sequencial, sugerindo que o tronco encefálico seja fundamental para execução de padrões sequenciais completos de *grooming* (Berntson, Jang, & Ronca, 1988; Berridge, 1989). No mesencéfalo, é possível encontrar estruturas providas da maioria dos neurônios com projeções serotoninérgicas para o prosencéfalo, como os núcleos da rafe (Xiao et al., 2017).

Os núcleos da rafe são um importante local de distribuição de projeções serotoninérgicas no sistema nervoso central. Os núcleos da rafe projetam neurônios serotoninérgicos para várias partes do cérebro, como: putâmen-caudado, córtex parieto-temporal, habênula, hipotálamo dorsal, globus pallidus, amígdala, núcleo leito da estria terminal, núcleo accumbens, córtex entorrinal, hipocampo, córtex piriforme, córtex pré-frontal medial, entre outras (ver Figura 1). A parte dorsal, chamada de núcleo dorsal da rafe (NDR), envia projeções para o córtex pré-frontal, núcleo leito da estria terminal, amígdala central, habênula lateral, entre outras. Nessa estrutura, podemos encontrar a maioria dos neurônios de serotonina projetando para o prosencéfalo e para estruturas não-límbicas, que





*Figura 2.* Modelo simplificado do duplo papel da serotonina em respostas defensivas mediadas pela amígdala e SCP. A serotonina liberada pelo NDR na amígdala aumenta comportamentos tipo ansiosos ou medo por meio de receptores 2A, 2C e 3, enquanto que por meio da projeção para a SCP, comportamentos de medo ou ansiedade são diminuídos via receptores 2A, 2C e 1A. Retirado e adaptado de Maximino (2012 p. 80).

Uma vez que a ansiedade pode desempenhar um papel no aumento de compulsões, a participação do NDR por meio de suas projeções serotoninérgicas nesse aumento merece ser investigada. Um estudo anterior investigou farmacologicamente esse núcleo, mas a compulsão estudada foi apenas a de consumo de álcool e não houve a apresentação de estímulos ansiogênicos (Tomkins e Fletcher, 1996). É pertinente estudar a ansiedade por meio da manipulação do sistema serotoninérgico por fármacos GABAérgicos, e avaliar seu efeito no comportamento de *grooming* em ratos. Logo, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação do núcleo dorsal da rafe na modulação do comportamento de *grooming* em uma situação de teste ansiogênica (teste em um campo aberto novo). Para tanto, o efeito de microinjeções no NDR de diferentes concentrações de agonista (muscimol) ou antagonista (bicuculina) do receptor GABA<sub>A</sub> sobre o *grooming* foi avaliado numa sessão em ambiente novo – um campo aberto.

## OBJETIVOS

### **Objetivo Geral**

Investigar a participação do núcleo dorsal da rafe na modulação do comportamento de *grooming* em uma situação de teste ansiogênica (teste em um campo aberto novo) por meio da administração de diferentes concentrações de muscimol e bicuculina.

### **Objetivos Específicos**

Avaliar o comportamento de *grooming* sob o efeito de diferentes concentrações de muscimol no núcleo dorsal da rafe em contexto ansiogênico.

Avaliar o comportamento de *grooming* sob o efeito de diferentes concentrações de bicuculina no núcleo dorsal da rafe em contexto ansiogênico.

## METODOLOGIA

### Sujeitos

Foram utilizados 41 ratos *Wistar*, experimentalmente ingênuos, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Estadual de Londrina, com peso entre 280-310 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas comunitárias (4 animais por caixa) com livre acesso a água e alimento. Entre a chegada dos animais do Biotério Central do Campus e o término do experimento, os animais permaneceram no biotério local do laboratório sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (período claro das 7:00 às 19:00 horas), temperatura controlada em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Todos os procedimentos experimentais adotados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (protocolo CEUA/UEL nº: 6237.2015.02)

### Implante de cânula-guia no núcleo dorsal da rafe

Para implantação da cânula no NDR, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg, i.p) e xilazina (13 mg/kg, i.p) e, após indução anestésica, foram fixados a um aparelho estereotáxico (Insight, Ribeirão Preto, BR) pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Em seguida, foi realizada a assepsia local e administração de lidocaína com fenilefrina (sc), anestésico local e vasoconstritor, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a incisão longitudinal a fim de expor a calvária e remover o periósteo com água oxigenada a 10%. O crânio foi perfurado com uma broca de uso odontológico para a fixação de cânula, seguindo-se coordenadas estabelecidas assumindo-se o Atlas de Paxinos e Watson (1998): ântero-posterior, - 7,80 mm em relação ao bregma; lateral, + 1,4~1,3 mm em relação à sutura sagital; vertical, - 5,2 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana; Incisivo, altura do bregma e da lambda iguais; torre inclinada lateralmente em  $14^\circ$ . A cânula foi posicionada para que ficasse 2 mm acima do NDR.

Através desse orifício, foi introduzida uma cânula de aço inoxidável (12 mm de comprimento), constituída por um segmento de agulha hipodérmica de 0,6 mm (26G) de diâmetro externo. A cânula foi fixada ao crânio por um parafuso previamente implantado na calota craniana e por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL Ind.

Com., Brasil). Um mandril de 0,3 mm de diâmetro externo foi introduzido na cânula, para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 0,2 ml de pentabiótico veterinário (Pentabiotico®, Fontoura-Wyeth, SP, Brazil, 80.000 UI, intramuscular). Depois da cirurgia os animais foram alojados em gaiolas de prolipropileno para recuperação por sete dias antes de serem submetidos aos testes experimentais.

### **Microinjeção de drogas**

Foram usadas duas concentrações de muscimol, agonista de receptor GABA<sub>A</sub>, (50ng/0,1µl ou 25ng/0,1µl; Sigma-Aldrich, USA) e duas concentrações de bicuculina, antagonista de receptor GABA<sub>A</sub>, (30 ng/0,1µl ou 15 ng/0,1µl; Sigma-Aldrich, USA). Houve um controle para os fármacos tratado apenas com o veículo solução salina (0,9%/0,1µl).

Todas as injeções foram feitas utilizando-se uma microseringa de 1,0µL (KH7001, Hamilton Co., EUA) controlada por uma bomba de infusão (Insight, Brasil). A microseringa foi acoplada a uma agulha injetora (0,3mm de diâmetro externo), 2 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio, e essa a um segmento de tubo de polietileno (P-10; Clay Adams, EUA). A injetora permaneceu dentro da cânula por 1min para maximizar a difusão da droga. O volume de droga injetado foi controlado pelo deslocamento de uma bolha de ar dentro de um tubo de polietileno. A administração das drogas foi realizada com os animais dentro da gaiola de prolipropileno. A seguir os animais foram individualmente testados no campo aberto.

### **Teste do campo aberto**

No dia do teste, os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais (Bicuculina 15 (n=7); Bicuculina 30 (n=9); Muscimol 25 (n=8); Muscimol 50 (n=8) e salina (n=9)).

Uma caixa de acrílico (30 cm x 30 cm x 30 cm), alocada em uma sala iluminada foi usada. Cada rato teve seu comportamento filmado por 20 min. As seguintes medidas comportamentais foram avaliadas: levantadas (*rearing*), considerado toda vez que o animal levanta seu corpo sobre as patas traseiras; posturas esticadas (*stretched attend postures*), quando mantém as patas traseiras imóveis, esticando seu corpo com as patas dianteiras e

retorna à posição inicial; tempo no centro, quando o animal permanece nos quatro quadrantes centrais da caixa; cruzamento de quadrantes, quando o animal faz cruzamento de um quadrante para o outro; e congelamento (*freezing*), quando o animal permanece imóvel sobre as quatro patas e sua parte ventral não está encostada no chão da caixa.

O comportamento de *grooming* foi mensurado quanto à sua frequência e tempo. Quatro componentes foram discernidos: lambida, focinho, cabeça e corpo:

1 – Lambida (Fase 1) - movimentos de fricção com as patas dianteiras perto do rosto e do nariz.

2 – Focinho (Fase 2) - movimentos de fricção com as patas dianteiras (cada um feito por uma pata) desde as vibrissas místicas até abaixo do olho em direção ao focinho.

3 – Cabeça (Fase 3): movimentos de fricção bilaterais para trás e para cima feitos por ambas as patas simultaneamente em direção à cabeça.

4 – Corpo (Fase 4) - limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, área genital e cauda. As coçadas no corpo (seguidas de lambidas) com as patas traseiras (*scratching*) também foram consideradas pertencentes a essa categoria.

Quando o animal suspendeu qualquer dessas ações de *grooming* (i.e., períodos de não-*grooming*), foi considerado como uma interrupção se o animal retomou a limpeza em até cinco segundos. O *grooming* rostral foi considerado a soma de Lambida, Focinho e Cabeça, enquanto que o *grooming* corporal apenas relacionado com o Corpo. Um episódio de *grooming* foi, portanto, composto pela soma do tempo de lambida, focinho, cabeça e corpo com interrupções menores do que 5 segundos. Interrupções maiores do que cinco segundos marcaram a separação entre dois diferentes episódios. O tempo total de *grooming* é obtido pela soma do tempo de todos os episódios. Uma cadeia estereotipada foi registrada sempre que fricções rápidas das patas dianteiras com a região rostral foram seguidas por uma série de movimentos mais lentos dirigidos à cabeça e então ao corpo (para descrições detalhadas de cadeias estereotipadas, ver Berridge et al., 1987; Berridge et al., 2005).

Os grupos foram comparados quanto ao número de episódios de *grooming*, sua duração total, duração da lambida, focinho, cabeça e corpo, porcentagem de transições incorretas e frequência de cadeias estereotipadas. A porcentagem de transições incorretas, que é a avaliação da transição de uma fase para outra do *grooming* de forma não-cefalocaudal, é uma medida que auxilia na observação do padrão sequencial desse comportamento e é obtida dividindo-se as transições cefalocaudais pelo total de transições. A observação dos vídeos foi realizada por uma avaliadora treinada (concordância intra-observadora maior de 80%).

## Histologia

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xilasina (13 mg/kg) e o corante Azul de Evans a 1% foi administrado no local da microinjeção das drogas no mesmo volume utilizado para a análise comportamental. A seguir os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração e posterior perfusão. A artéria aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática, para uma melhor perfusão cerebral. A aurícula direita sofreu uma incisão para escoamento do sangue perfusado e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. Foram administrados solução fisiológica (NaCl 0,9%) por 5 minutos e solução tamponada de formalina a 10% por 10 minutos em cada rato.

Após o procedimento, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formalina a 10% para fixação. Decorridas 48 horas, os cérebros foram seccionados (em cortes frontais de 60  $\mu\text{m}$ ) com auxílio de um criostato (Leica CM1520). As várias secções foram coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1998).

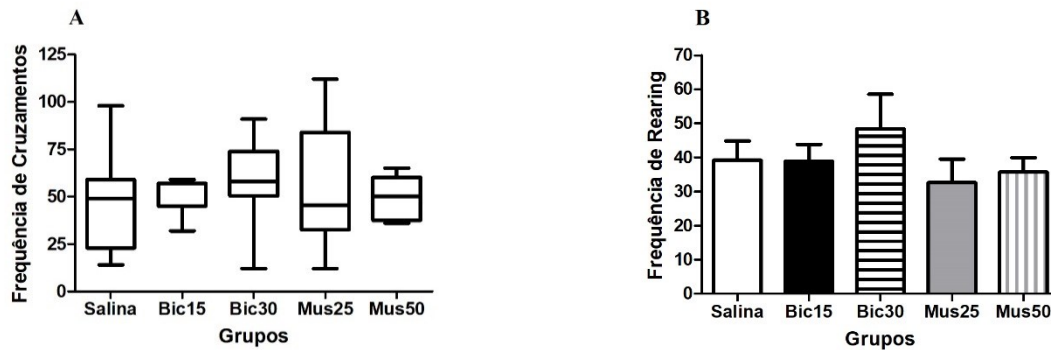
## Análises de dados

Primeiramente, os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade com os testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Naquelas medidas cujas amostras foram normais e homogêneas foi utilizado análise de variância (ANOVA) de uma via e quando necessário foi utilizado o *post hoc* de Dunnett. Para as demais foi utilizado Kruskal-Wallis e quando necessário foi utilizado o teste *post hoc* de comparação múltipla de Dunn. Os resultados foram considerados significantes sempre que o valor de  $p$  fosse menor que 0,05. Os dados paramétricos foram apresentados com a média e erro padrão, enquanto que os não-paramétricos foram apresentados em *box plot*, com mediana, o primeiro quartil, o terceiro quartil, o mínimo e máximo.

Nos Apêndices é possível encontrar os dados brutos, resultados das análises estatísticas, os testes de normalidade e homogeneidade.

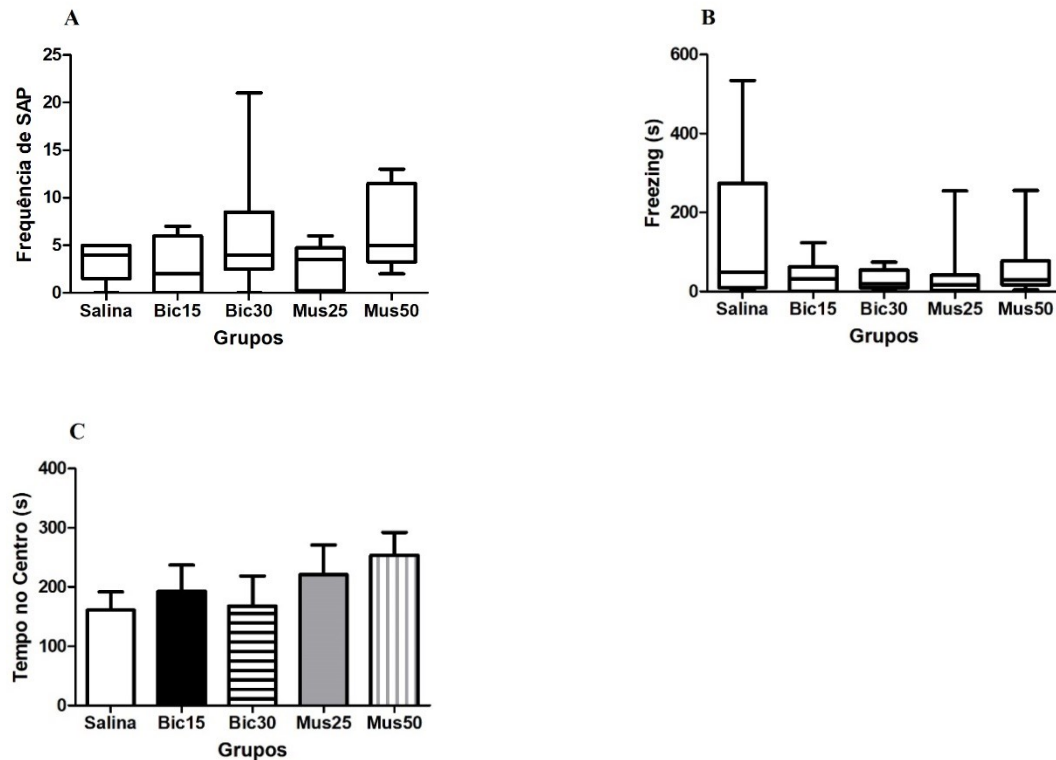
## RESULTADOS

Não houve efeito significativo para as medidas de cruzamentos (Kruskal-Wallis;  $H = 2,489$ ;  $p = 0,6467$ ) e levantar (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 0,7587$ ;  $p = 0,5590$ ) sob diferentes concentrações de muscimol e bicuculina no NDR em ratos em campo aberto.



*Figura 3.* Resultados dos comportamentos de cruzamentos (A) e levantar (B) de diferentes concentrações de muscimol (50ng/0,1µl ou 25ng/0,1µl) e bicuculina (30ng/0,1µl ou 15ng/0,1µl) no NDR no campo aberto em sessão de 20 minutos. O número de animais por grupo foi de 7 – 9. Nas medidas não-paramétricas (cruzamentos) como na paramétrica (*rearing*) não foram encontrados efeitos significativos.

Não houve efeito significativo para as medidas de SAP (Kruskal-Wallis;  $H = 5,187$ ;  $p = 0,2687$ ), *freezing* (Kruskal-Wallis;  $H = 1,550$ ;  $p = 0,8177$ ) e tempo no centro (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 0,7923$ ;  $p = 0,5379$ ) sob diferentes concentrações de muscimol e bicuculina no NDR em ratos em campo aberto.



*Figura 4.* Resultados dos comportamentos de frequência de SAP (A), *Freezing* (B) e Tempo no Centro (C) de diferentes concentrações de muscimol (50ng/0,1 $\mu$ l ou 25ng/0,1 $\mu$ l) e bicuculina (30ng/0,1 $\mu$ l ou 15ng/0,1 $\mu$ l) no NDR no campo aberto em sessão de 20 minutos.

Houve efeito significativo em *grooming* rostral (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 2,802$ ;  $p = 0,0401$ ), no entanto, o teste de Dunnett não detectou diferenças entre grupos. Não houve efeito significativo em tempo total de *grooming* (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 2,490$ ;  $p = 0,0604$ ) e tempo de corporal (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 0,7894$ ;  $p = 0,5397$ ) sob diferentes concentrações de muscimol e bicuculina no NDR em ratos no campo aberto.

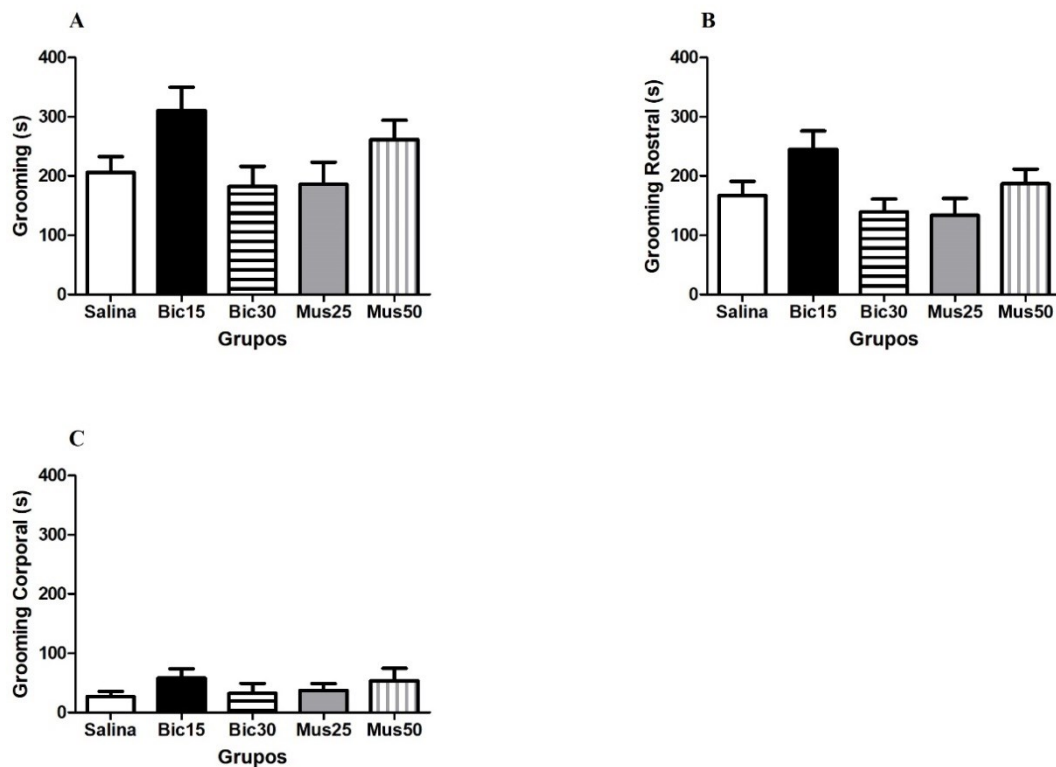


Figura 5. Resultados da duração de *grooming* (A), *grooming* rostral (B) e *grooming* corporal (C) de diferentes concentrações de muscimol (50ng/0,1µl ou 25ng/0,1µl) e bicuculina (30ng/0,1µl ou 15ng/0,1µl) no NDR no campo aberto em sessão de 20 minutos. Foi encontrado efeito de significância em *grooming* rostral,  $p > 0,05$ .

Não houve efeito significativo em episódios de *grooming* (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 0,0590$ ;  $p = 0,9932$ ), cadeias (Kruskal-Wallis;  $H = 7,521$ ;  $p = 0,1108$ ), transições (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 2,138$ ;  $p = 0,0960$ ) e porcentagem de transições incorretas (ANOVA;  $F_{(4,40)} = 0,6246$ ;  $p = 0,6480$ ) sob diferentes concentrações de muscimol e bicuculina no NDR em ratos em campo aberto.

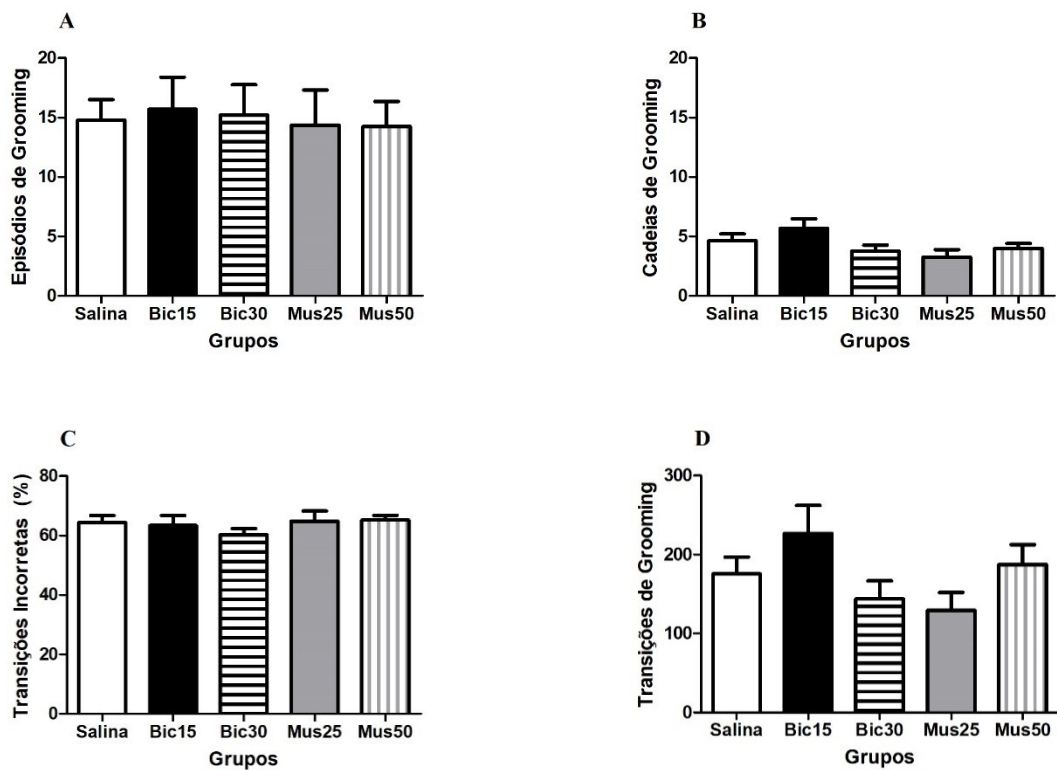


Figura 6. Resultados relativos a episódios de *grooming* (A), cadeias de *grooming* (B), transições incorretas de *grooming* (C) e transições de *grooming* (D) de diferentes concentrações de muscimol (50ng/0,1 $\mu$ l ou 25ng/0,1 $\mu$ l) e bicuculina (30ng/0,1 $\mu$ l ou 15ng/0,1 $\mu$ l) no NDR no campo aberto em sessão de 20 minutos. Não foi possível encontrar efeito significativo sob as concentrações utilizadas.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a participação do núcleo dorsal da rafe no controle do comportamento de *grooming* induzido por novidade. Para tanto, ratos foram submetidos a microinjeções de diferentes concentrações de bicuculina e muscimol no NDR e foram avaliados em um campo aberto. Os resultados do estudo demonstraram efeito significativo no *grooming* rostral e uma tendência estatística em total de transições, tempo total de *grooming* e total de cadeias.

Não foi possível observar diferenças entre os grupos quanto à atividade locomotora e exploratória. É possível comparar esse resultado com outros estudos que inibiram a atividade do NDR com microinjeções de agonistas GABA<sub>A</sub>. Przewrocka et al., (1979) avaliaram o efeito de concentração de muscimol sobre o comportamento locomotor e consumo de comida na gaiola-viveiro em ratos. Os resultados demonstraram que as concentrações de 25 ng, 50 ng e 100 ng de muscimol no NDR aumentaram esses comportamentos. Ratos que foram expostos a injeções de bicuculina, antes da aplicação de muscimol, diminuíram a frequência da maioria desses comportamentos, o que implica os receptores GABA<sub>A</sub> no controle desses comportamentos. Wirtshafter & Klitenick (1989) observaram que concentrações de 6,25 ng e 25 ng de muscimol no NDR não demonstraram alteração no comportamento locomotor no campo aberto, apenas a concentração de 100 ng de muscimol. Bueno (2002) observou que a concentração de 100 ng de muscimol no NDR não alterou a locomoção no campo aberto. Esses dados sugerem que é possível encontrar resultados discrepantes e semelhantes ao presente estudo, contudo, a diferença metodológica pode ser uma variável que pode ter influenciado na diferença desses resultados, portanto, são necessárias mais pesquisas com as metodologias utilizadas no NDR para observarmos um resultado mais consistente.

Poucos estudos investigaram o efeito da bicuculina no NDR sobre comportamentos locomotores. Como já mencionado acima, a bicuculina injetada no NDR, antes da aplicação de um agonista GABAérgico, parece diminuir comportamento locomotor em testes na gaiola-viveiro (Przewxocka et al., 1979). No presente estudo, não foi possível observar diminuição no comportamento locomotor, por isso, é necessário avaliar outras concentrações dessa droga para entender melhor seu efeito sobre o comportamento.

Foi observado efeito no *grooming* rostral, contudo, não foi possível identificar em qual grupo ocorreu, porém, a média do grupo “Bicuculina 15” e “Muscimol 50” são as que mais diferem da média do grupo salina, sugerindo serem esses os grupos com maiores efeitos. Ansiedade induzida pela novidade pode ser responsável por aumento de *grooming* rostral. Ratos expostos a ambientes com mesmo grau de novidade, mas com diferentes graus de aversividade, apresentaram mais *grooming* rostral do que *grooming* corporal (Kalueff e Tuohimaa, 2005). Ratos expostos tanto em labirinto em cruz elevado em sessões de dez minutos quanto em campo aberto em sessões de quinze minutos fazem *grooming* rostral por mais tempo comparado ao *grooming* corporal (Estanislau, 2012; Joanna Komorowska & Pellis, 2004). Portanto, além de ser possível encontrar aumento de *grooming* rostral, esse comportamento parece ser uma medida pertinente em experimentos que testam níveis de ansiedade induzida pela novidade, pois os resultados demonstram uma maior quantidade desse comportamento nesses ambientes.

Comportamentos com características compulsivas podem ser influenciados pela administração de muscimol e bicuculina no NDR. É possível notar que a administração de muscimol nessa estrutura em roedores aumenta comportamentos de consumo de álcool ou comida, enquanto que a bicuculina diminui a frequência desses comportamentos (Przewxocka et al., 1979; Tomkins & Fletcher, 1996; Tomkins, Sellers, & Fletcher, 1994). Com base nisso, os comportamentos de consumo de álcool ou comida podem ser analisados como

comportamentos com características compulsivas, sendo perseverantes, inflexíveis e persistentes, portanto, nesses aspectos semelhantes ao *grooming*.

Os tratamentos não demonstraram efeito no padrão sequencial de *grooming* nem no tempo no centro do campo aberto sob as concentrações investigadas. Esse dado condiz em parte com a literatura, pois ratos que foram submetidos a descerebração ou lesões no mesencéfalo (local onde fica o NDR) não foram afetados em seu padrão sequencial de *grooming* ou atividade locomotora, embora se observasse dificuldade em realizá-los. A descerebração só causou diminuição no padrão sequencial quando os ratos eram descerebrados em regiões mais caudais, sugerindo a importância do tronco encefálico na execução completa do padrão sequencial de *grooming*. (Berntson et al., 1988; Berridge, 1989; Barry L Jacobs & Cohen, 1976). Contudo, em outro estudo, a injeção de GABA no NDR em camundongos diminuiu a frequência de entradas e tempo no centro do campo aberto (Xiao et al., 2017). Logo, os resultados do presente estudo demonstram que as concentrações utilizadas no NDR parecem não influenciar no padrão sequencial do *grooming*, ao mesmo tempo que é possível observar uma tendência estatística em total de transições, tempo total de *grooming* e total de cadeias.

Estudos anteriores demonstraram que a frequência de comportamentos que ocorrem em ambientes familiares, como locomoção, *freezing*, SAP ou *grooming*, parece ser diferente comparada à observada em ambientes novos em ratos. Bindra e Spinner (1958) demonstraram que os comportamentos de *freezing*, locomoção e *grooming* aumentam de frequência ao expor ratos em ambientes novos. Bouwknecht et al. (2007) demonstraram que ratos expostos a maiores graus de luminosidade no campo aberto tendem a reduzir a atividade locomotora, *grooming*, levantar e tempo no centro comparados a ratos expostos a ambientes menos ansiogênicos. No presente estudo não foi possível observar diferenças na maioria dos comportamentos de *grooming*, exceto o *grooming* rostral. É hipotetizado que o aumento do

*grooming* rostral possa estar relacionado à maior presença de serotonina nas regiões cerebrais projetadas pelo NDR e que possa estar mais relacionado com ansiedade, pois esse resultado não aparece em outros comportamentos (Kalueff & Tuohimaa, 2005).

A administração de bicuculina e muscimol no NDR pode ter aumentado e diminuído, respectivamente, a liberação de 5-HT em outras regiões cerebrais. Já é consistente que a injeção de GABA no NDR pode diminuir a disponibilidade de 5-HT em outras áreas cerebrais (Xiao et al., 2017). A presença da serotonina pode ter influenciado nos resultados do presente trabalho, pois foi observado que em modelos de ratos com *knockout* para transportador de serotonina diminuíram a exploração horizontal central e exploração vertical no campo aberto, sendo possível observar um aumento da tigmotaxia no campo aberto e na frequência de *grooming* (Kalueff, Olivier, Nonkes, & Homberg, 2010; Olivier et al., 2008; Olivier et al., 2008b; Zhou, Sari, & Zhang, 2000). Esses resultados demonstram que ratos com *knockout* para transportador de serotonina apresentam maiores quantidades de serotonina extracelular. Isso pode ter certa semelhança com o tratamento com bicuculina do presente estudo, pois o mesmo pode ter levado a aumento da disponibilidade de serotonina nas fendas sinápticas. Logo, ainda que não tenha sido realizado uma microdiálise, os resultados comportamentais apresentados de inibição e desinibição do NDR podem ter relação com a diminuição e aumento da disponibilidade de serotonina nas vias cerebrais.

É possível discutir os resultados do presente estudo com a hipótese Deakin-Graeff e com outras drogas agonistas e antagonistas GABA<sub>A</sub>. O ponto central dessa hipótese é que os sistemas cerebrais de serotonina estão envolvidos com respostas adaptativas a eventos aversivos. Os autores relatam que a inativação de projeções NDR, como microinjeções de benzodiazepínicos ou de GABA, exercem efeitos tipo-ansiolíticos e reduzem medidas comportamentais de ansiedade (Graeff & Deakin, 1991; Green & Hodges, 1986; Jones, Paterson, & Roberts, 1986; Thiébot, Jobert, & Soubrié, 1979). No presente estudo, não foi

possível observar a diminuição de comportamentos de ansiedade, como SAP, das concentrações de agonista e antagonista GABA<sub>A</sub> no NDR. Da mesma forma, a microinjeção de agonista inverso do receptor de benzodiazepínico no NDR em ratos em uma caixa retangular de acrílico, ou seja, aumentando a disponibilidade de serotonina extracelular, diminuiu o comportamento locomotor (Jones et al., 1986). Logo, as concentrações de muscimol e bicuculina no NDR não diminuíram ou aumentaram comportamentos tipo ansiosos, porém, os resultados podem servir para outros estudos que investigaram a inibição e desinibição do NDR com outros GABAérgicos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ansiedade é uma emoção que está presente em situações em que o perigo é incerto ou potencial. Os estudos em modelos animais facilitam um melhor entendimento sobre os mecanismos subjacentes a ansiedade. Para isso, estudar estruturas que podem estar relacionadas a essa emoção e comportamentos em ambientes controláveis é uma maneira de avançar cientificamente nessa temática.

O presente estudo se propôs a estudar os efeitos da inibição e desinibição do núcleo dorsal da rafe sobre o comportamento de *grooming* em ratos em um ambiente novo. As concentrações utilizadas no NDR demonstraram aumento no *grooming* rostral, não influenciaram no padrão sequencial desse comportamento e mostraram tendência estatística em total de transições, tempo total de *grooming* e total de cadeias. Esses resultados são importantes, pois em parte condizem com a literatura e trazem também novos resultados para investigação da ansiedade induzida pela novidade e a relação com o NDR. Além disso, o presente estudo pode servir de base para estudos posteriores que pretendem investigar outros comportamentos com relação ao núcleo dorsal da rafe.

Sugere-se mais estudos que investiguem outras concentrações de bicuculina e muscimol no núcleo dorsal da rafe. No presente estudo, foram utilizadas concentrações baseadas em outros artigos científicos. Contudo, é interessante investigar concentrações de menores de muscimol e bicuculina, pois, essas concentrações possuem potencial de apresentar aumento de *grooming*, em caso de desinibição, e diminuição, no caso da inibição e podendo trazer resultados que permitem criar uma curva dose-resposta do papel do núcleo dorsal da rafe sobre comportamento de *grooming*.

**REFERÊNCIAS**

- Adolph, E. F. (1947). Tolerance to heat and dehydration in several species of mammals. *The American Journal of Physiology*, *151*, 564–575.  
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1947.151.2.564>
- APA, A. P. A. (2013). *Manual Diagnóstico E Estatístico De Transtornos Mentais (DSM 5)*.
- Berntson, G. G., Jang, J. F., & Ronca, A. E. (1988). Brainstem Systems and Grooming Behaviors. *Ann N Y Acad Sci*, *525*(M), 350–362.
- Berridge, K. C. (1989). Progressive degradation of serial grooming chains by descending decerebration. *Behavioural Brain Research*, *33*, 241–253.
- Berridge, K. C., Fentress, J. C., & Parr, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioural Brain Research*, *23*(1), 59–68.  
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90242-7](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90242-7)
- Berridge, K. C., & Whishaw, I. Q. (1992). Control of Serial Order in a Grooming Sequence. *Experimental Brain Research*, *90*, 275–290. <https://doi.org/10.1007/BF00227239>
- Bindra, D., & Spinner, N. (1958). Response to different degrees of novelty: the incidence of various activities. *J Exp Anal Behav.*, 341–350.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. *Annual Review of Psychology*, *39*(1), 43–68.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ps.39.020188.000355>
- Bolles, R. C. (1960). Grooming behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *53*(3), 306–310. <https://doi.org/10.1037/h0045421>

- Bouwknicht, J. A., Spiga, F., Staub, D. R., Hale, M. W., Shekhar, A., & Lowry, C. A. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors : Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin*, *72*, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.12.009>
- Boyer, P., & Liénard, P. (2006). Why ritualized behavior? Precaution Systems and action parsing in developmental, pathological and cultural rituals. *Behavioral and Brain Sciences*, *29*(06), 595–650. <https://doi.org/10.1017/S0140525X06009332>
- Bueno, C. H. (2002). *Efeitos da inibição reversível por muscimol do núcleo dorsal da rafe, da matéria cinzenta periaquedutal dorsal, e da amígdala basolateral sobre diferentes medidas de ansiedade*. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Carlson, N. R. (2013). *Physiology of Behavior*. (Pearson, Ed.) (11th ed.).
- Corr, P. J. (2006). *Understanding biological psychology. Basic psychology*. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=psyc5&AN=2007-00725-000>
- Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology and Neuroscience*, *5*(1), 105–112. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2012.1.14>
- Graeff, F. G., & Deakin, J. F. W. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, *5*, 3005–315. <https://doi.org/10.1177/026988119100500414>
- Green, S., & Hodges, H. (1986). Differential Effects of Dorsal Raphe Lesions and Intraraphe GABA and Benzodiazepines on Conflict Behavior in Rats. *Behavioral And Neural*

*Biology*, 29, 13–29.

- Grove, G., Coplan, J., Margolin, L., & Hollander, E. (1996). The Neuroanatomy of Serotonin (5-HT) Dysregulation in Obsessive-Compulsive Disorder. *CNS Spectrums*, 1(2), 16–22. <https://doi.org/10.1017/S1092852900002595>
- Hainsworth, F. (1967). Saliva Spreading, Activity, and Body Temperature Regulation in the Rat. *American Journal of Physiology--Legacy ...*, 212(6), 1288–1292. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.6.1288>
- Hirschtritt, M. E., Bloch, M. H., & Mathews, C. A. (2017). Obsessive-compulsive disorder advances in diagnosis and treatment. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(13), 1358–1367. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2200>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Jacobs, B. L., & Cohen, A. (1976). Differential Behavioral Effects of Lesions of the Median or Dorsal Raphe Nuclei in Rats : Open Field and Pain-Elicited Aggression. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 90(1), 102–108.
- Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., & Gispen, W. H. (1979). Novelty and grooming behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 25(4), 563–572. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(79\)90362-5](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(79)90362-5)
- Jones, B. J., Paterson, I. A., & Roberts, M. H. T. (1986). Microinjections of Methyl-/3-Carboline-3-Carboxylate Into the Dorsal Raphe Nucleus: Behavioural Consequences. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 24, 1487–1489.
- Kalueff, A. V. (2003). Measuring grooming in stress and comfort. *Proceedings of 3rd Measuring Behavior Conference*, 148–149.

- Kalueff, A. V., Olivier, J. D. A., Nonkes, L. J. P., & Homberg, J. R. (2010). Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *34*(3), 373–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.08.003>
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Research*, *1028*(1), 75–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.001>
- Kalueff, A. V, Fox, M. A., & Gallagher, P. S. (2007). Hypolocomotion , anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice, 389–400. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00270.x>
- Kalueff, A. V, & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA In Memory And Anxiety. *Depression and Anxiety*, *4*(December 2015), 100–110. <https://doi.org/10.1002/da.20262>
- Kalueff, A. V, Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Ann, M., Fentress, J. C., ... Sciences, C. (2016). HHS Public Access. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45–59.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8.Neurobiology>
- Kalueff, A. V, Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2015). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Publishing Group*, *17*(1), 45–59.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kalueff, A. V, & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats : potential utility for neurobehavioural stress research, *143*, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.001>
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2015).

- Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62(June 2005), 593–768.
- Kessler, R. C., Chiu, W. T., Demler, O., & Walters, E. E. (2005). Prevalence, Severity, and Comorbidity of 12-Month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62(June), 617–709.
- Komorowska, J., & Pellis, S. M. (2004). Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural Processes*, 67, 287–293.  
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.05.001>
- 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.
- Maio, T. P., Filgueiras, G. B., Cunha, D. C., & Estanislau, C. (2014). Animal Models of Obsessive-Compulsive Disorder: Strain Differences. *World Journal of Neuroscience*, 04(03), 240–246. <https://doi.org/10.4236/wjns.2014.43027>
- Maximino, C. (2012). *Serotonin and Anxiety Neuroanatomical, Pharmacological, and Functional Aspects*. <https://doi.org/10.1007/978-981-4021-99-9>
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>
- Nitzl, D., & Siegel, J. (1997). GABA release in the dorsal raphe nucleus : role in the control of REM sleep. *Am J Physiol.*, 273, 451–455.
- Olivier, J. D. A., Cools, A. R., Olivier, B., Homberg, J. R., Cuppen, E., & Ellenbroek, B. A.

- (2008). Stress-induced hyperthermia and basal body temperature are mediated by different 5-HT 1A receptor populations : A study in SERT knockout rats. *European Journal of Pharmacology*, 590, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.008>
- Olivier, J. D. A., Van Der Hart, M. G. C., Van Swelm, R. P. L., Dederen, P. J., Cremers, T., Deen, P. M. T., ... Ellenbroek, B. A. (2008). A Study In Male And Female 5-Ht Transporter Knockout Rats : An Animal Model For Anxiety And Depression Disorders. *Neuroscience*, 152, 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.032>
- Organization, W. H. (2017). Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates* (4th ed.). Academic Press.
- Przewxocka, H., Stala, L. ., & Scheel-Krülger, J. . (1979). Evidence that GABA in the Nucleus Dorsalis Raphe Induces Stimulation of Locomotor Activity and Eating Behavior. *Life Sciences*, Vol . 25, 937–946.
- Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A. R. A. M., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Review*, 72(3), 825–852. <https://doi.org/papers://8287C5F1-9155-4F4F-AD55-C0335EA1C5C2/Paper/p25496>
- Steimer, T. (2011). Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(4), 495–506.
- Thiébot, M.-H., Jobert, A., & Soubrié, P. (1979). Conditioned Suppression Of Behavior: Its Reversal By Intra Raphe Microinjection Of Chlorduzepoxide And GABA. *Neuroscience Letters*, 16(1960), 213–217.
- Tomkins, D. M., & Fletcher, P. J. (1996). Evidence that GABA<sub>A</sub> but not GABA<sub>B</sub> receptor

activation in the dorsal raphe nucleus modulates ethanol intake in Wistar rats.

*Behavioural Pharmacology*, 7, 85–93.

Tomkins, D. M., Sellers, E. M., & Fletcher, P. J. (1994). Median and Dorsal Raphe Injections of the 5-HT<sub>1A</sub> Agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA<sub>A</sub> Agonist, Muscimol, Increase Voluntary Ethanol Intake in Wistar Rats, *33*(3), 349–358.

van Erp, A. M. M., Kruk, M. R., Meelis, W., & Willekens-Bramer, D. C. (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. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90072-8)

Van Iersel, J. J. A., & Angela Bol, A. C. (1958). Preening of two tern species. A study on displacement activities. *Behaviour*, *13*(1/2), 1–88.

Veloso, A. W. N., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., & Estanislau, C. (2016). Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychology and Neuroscience*, *9*(1), 91–104. <https://doi.org/10.1037/pne0000038>

Wirtshafter, D., & Klitenick, M. A. (1989). Comparative Studies of Locomotor Behavior Following Microinjections of Muscimol Into Various Sites in the Paramedian Tegmentum. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *32*, 625–628.

Xiao, J., Song, M., Li, F., Liu, X., Anwar, A., & Zhao, H. (2017). Effects of GABA microinjection into dorsal raphe nucleus on behavior and activity of lateral habenular neurons in mice. *Experimental Neurology*, *298*(February), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.08.012>

Zhou, F. C., Sari, Y., & Zhang, J. K. (2000). Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Developmental Brain Research*, *119*, 33–45.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

### Dados brutos e Resultados das Análises Estatísticas

Quantidade	Rato	Tratamento	Entradas	Rearing	SAP	Freezing	Grooming		% Transições Incorretas	Grooming tempo	Rostral	Corporal
							Episódios	Transições				
1	R1_Azul_C1	Salina	49	50	0	12,639	8	155	50,32258	175,9	138,9	12,7
2	R1_Azul_C2	Salina	54	39	5	10,394	16	249	70,28112	299,0	206,5	78,0
3	R1_Azul_C7	Salina	26	38	4	54,625	18	268	65,67164	298,3	280,3	8,3
4	R1_Preto_C1	Salina	14	8	5	534,098	12	108	68,51852	95,6	79,1	0,0
5	R1_Verde_C1	Salina	20	28	5	458,33	9	87	62,06897	103,5	85,5	2,0
6	R1_Verde_C3	Salina	98	71	1	89,717	18	162	68,51852	194,5	157,3	37,0
7	R3_Azul_C3	Salina	43	44	2	48,76	13	170	55,29412	233,3	164,3	62,1
8	R3_Verde_C3	Salina	49	41	5	8,345	25	243	70,78189	292,7	259,8	30,2
9	R4_Azul_C4	Salina	64	34	4	4,32	14	139	67,6259	162,8	134,2	9,5
1	R1_Preto_C4	Bicu 15	57	48	0	0	17	269	79,18216	323,6	290,8	36,7
2	R1_Preto_C7	Bicu 15	54	55	2	62,74	17	187	60,42781	324,5	196,8	109,9
3	R4_Verde_C7	Bicu 15	32	19	7	0,406	14	211	55,45024	313,8	280,9	21,1
4	R2_Preto_C7	Bicu 15	45	30	5	123,236	8	137	59,12409	210,3	164,9	44,7
5	R3_Preto_C4	Bicu 15	57	51	6	31,866	6	123	61,78862	147,8	130,2	6,2
6	R4_Preto_C7	Bicu 15	57	30	0	55,246	25	261	55,55556	402,6	279,9	105,1
7	R4_Azul_C5	Bicu 15	59	39	0	4,902	23	399	71,6792	452,4	369,3	83,0
1	R1_Azul_C3	Bicu 30	91	69	0	19,383	15	238	70,58824	268,5	247,6	29,1
2	R2_Azul_C8	Bicu 30	85	107	4	55,048	20	151	62,25166	141,4	124,1	19,3
3	R4_Preto_C8	Bicu 30	55	40	4	74,281	19	173	55,49133	239,8	187,8	37,4
4	R4_Verde_C1	Bicu 30	58	75	2	14,219	16	162	65,4321	173,3	117,7	16,8
5	R2_Verde_C4	Bicu 30	12	10	7	54,812	2	46	58,69565	72,1	67,0	3,9
6	R2_Verde_C9	Bicu 30	56	48	8	3,767	12	71	49,29577	81,6	75,8	4,8

7	R4_Azul_C9	Bicu 30	63	21	21	17,386	7	63	53,96825	64,6	60,5	3,1
8	R3_Azul_C8	Bicu 30	46	28	3	0	28	205	63,90244	233,8	196,3	13,3
9	R3_Azul_C9	Bicu 30	62	38	9	39,263	18	186	62,36559	365,7	175,6	163,3
1	R1_Preto_C8	Mus 25	84	50	3	12,775	13	118	55,08475	173,0	118,1	46,4
2	R1_Verde_C5	Mus 25	34	29	6	254,616	16	104	75	135,6	87,5	19,8
3	R1_Verde_C9	Mus 25	112	52	0	1,651	31	172	53,48837	270,9	173,8	68,6
4	R2_Preto_C4	Mus 25	84	51	5	41,972	12	82	81,70732	82,0	66,0	16,1
5	R3_Preto_C7	Mus 25	32	14	4	38,346	9	136	61,02941	188,4	151,8	27,0
6	R3_Verde_C7	Mus 25	34	20	4	19,521	18	240	63,33333	334,8	288,8	20,3
7	R3_Verde_C8	Mus 25	12	1	0	4,729	2	22	68,18182	23,6	21,5	0,0
8	R4_Preto_C4	Mus 25	57	44	1	2,784	14	160	60,625	280,3	159,4	99,1
1	R1_Verde_C2	Mus 50	65	44	4	25,332	20	292	63,0137	381,1	195,2	126,1
2	R2_Azul_C3	Mus 50	39	54	5	93,108	7	158	70,25316	322,2	164,8	152,5
3	R2_Azul_C4	Mus 50	37	26	13	30,407	20	253	60,86957	316,2	267,7	34,3
4	R2_Azul_C6	Mus 50	58	23	3	4,035	13	89	67,41573	103,6	94,2	2,3
5	R3_Verde_C6	Mus 50	36	23	2	30,422	20	254	69,29134	330,6	305,9	12,3
6	R4_Azul_C1	Mus 50	50	30	10	255,644	7	126	66,66667	197,7	153,6	13,1
7	R4_Azul_C3	Mus 50	50	47	12	31,626	18	157	57,32484	187,9	166,3	8,9
8	R4_Preto_C2	Mus 50	61	39	5	13,768	9	171	66,66667	255,7	150,9	80,5

## Teste de Normalidade e Homogeneidade

### Teste de Normalidade

Grupos		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.
Entradas	Salina	,160	9	,200*	,935	9	,527
	Bic15	,312	7	,038	,758	7	,015
	Bic30	,214	9	,200*	,911	9	,320
	Mus25	,241	8	,190	,925	8	,471
Rearing	Mus50	,199	8	,200*	,906	8	,329
	Salina	,166	9	,200*	,947	9	,659
	Bic15	,185	7	,200*	,942	7	,653
	Bic30	,173	9	,200*	,948	9	,670
	Mus25	,220	8	,200*	,889	8	,229
SAP	Mus50	,186	8	,200*	,908	8	,342
	Salina	,279	9	,042	,804	9	,023
	Bic15	,252	7	,200*	,834	7	,087
	Bic30	,229	9	,192	,826	9	,041
	Mus25	,188	8	,200*	,910	8	,356
Freezing_t	Mus50	,284	8	,056	,873	8	,163
	Salina	,366	9	,001	,664	9	,001
	Bic15	,209	7	,200*	,870	7	,186
	Bic30	,227	9	,200*	,921	9	,404
Grooming_ep	Mus25	,399	8	,000	,579	8	,000
	Mus50	,386	8	,001	,658	8	,001
	Salina	,157	9	,200*	,953	9	,725
	Bic15	,148	7	,200*	,943	7	,670
	Bic30	,155	9	,200*	,973	9	,920
Transições	Mus25	,206	8	,200*	,928	8	,501
	Mus50	,236	8	,200*	,813	8	,040
	Salina	,202	9	,200*	,924	9	,430
	Bic15	,184	7	,200*	,929	7	,539
	Bic30	,208	9	,200*	,914	9	,344
Trans_incor	Mus25	,130	8	,200*	,991	8	,996
	Mus50	,217	8	,200*	,930	8	,512
	Salina	,241	9	,142	,835	9	,051
	Bic15	,283	7	,096	,852	7	,127
	Bic30	,178	9	,200*	,981	9	,971
Grooming_t	Mus25	,185	8	,200*	,937	8	,587
	Mus50	,256	8	,132	,925	8	,470
	Salina	,194	9	,200*	,898	9	,242
	Bic15	,226	7	,200*	,951	7	,738
	Bic30	,169	9	,200*	,930	9	,485
Rostral	Mus25	,164	8	,200*	,972	8	,912
	Mus50	,221	8	,200*	,943	8	,639
	Salina	,184	9	,200*	,934	9	,521
	Bic15	,235	7	,200*	,944	7	,671
	Bic30	,165	9	,200*	,928	9	,465
Corporal	Mus25	,184	8	,200*	,957	8	,786
	Mus50	,246	8	,169	,910	8	,353
	Salina	,248	9	,117	,867	9	,114
	Bic15	,199	7	,200*	,914	7	,423
	Bic30	,349	9	,002	,600	9	,000
	Mus25	,248	8	,161	,897	8	,272
	Mus50	,256	8	,132	,826	8	,054

\*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

**Teste de Homogeneidade de Variância**

Grupos		Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
Entradas	Com base em média	2,875	4	36	,036
	Com base em mediana	2,564	4	36	,055
	Com base em mediana e com df ajustado	2,564	4	26,819	,061
	Com base em média aparada	2,929	4	36	,034
Rearing	Com base em média	2,255	4	36	,082
	Com base em mediana	1,529	4	36	,214
	Com base em mediana e com df ajustado	1,529	4	18,249	,235
	Com base em média aparada	2,133	4	36	,097
SAP_#	Com base em média	2,214	4	36	,087
	Com base em mediana	1,029	4	36	,406
	Com base em mediana e com df ajustado	1,029	4	16,109	,422
	Com base em média aparada	2,077	4	36	,104
Freezing_t	Com base em média	5,662	4	36	,001
	Com base em mediana	1,389	4	36	,257
	Com base em mediana e com df ajustado	1,389	4	13,559	,289
	Com base em média aparada	4,211	4	36	,007
Grooming_ep	Com base em média	,221	4	36	,925
	Com base em mediana	,194	4	36	,940
	Com base em mediana e com df ajustado	,194	4	27,405	,939
	Com base em média aparada	,220	4	36	,926
Transições	Com base em média	,393	4	36	,812
	Com base em mediana	,248	4	36	,909
	Com base em mediana e com df ajustado	,248	4	32,452	,909
	Com base em média aparada	,370	4	36	,828
Trans_incor	Com base em média	1,201	4	36	,327
	Com base em mediana	,597	4	36	,667
	Com base em mediana e com df ajustado	,597	4	30,094	,668
	Com base em média aparada	1,058	4	36	,391
Grooming_t	Com base em média	,163	4	36	,955
	Com base em mediana	,160	4	36	,957
	Com base em mediana e com df ajustado	,160	4	32,444	,957
	Com base em média aparada	,156	4	36	,959
Rostral	Com base em média	,221	4	36	,925
	Com base em mediana	,154	4	36	,960
	Com base em mediana e com df ajustado	,154	4	32,526	,960
	Com base em média aparada	,231	4	36	,919
Corporal	Com base em média	1,515	4	36	,218
	Com base em mediana	,628	4	36	,646
	Com base em mediana e com df ajustado	,628	4	25,813	,647
	Com base em média aparada	1,369	4	36	,264