



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ WILSON NAZARETH VELOSO

**CURSO TEMPORAL E DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DA
AUTOLIMPEZA DE RATOS EM RESPOSTA A DIFERENTES
ESTRESSORES AMBIENTAIS**

Londrina
2012

ANDRÉ WILSON NAZARETH VELOSO *

**CURSO TEMPORAL E DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DA
AUTOLIMPEZA DE RATOS EM RESPOSTA A DIFERENTES
ESTRESSORES AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Análise do Comportamento da Universidade Estadual de Londrina, como cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Célio R. Estanislau

* Bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V443c Veloso, André Wilson Nazareth.
Curso temporal e distribuição regional da autolimpeza de ratos em resposta a diferentes estressores ambientais / André Wilson Nazareth Veloso. – Londrina, 2012.
x, 50 f. : il.

Orientador: Célio Roberto Estanislau.
Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Comportamento – Análise – Teses. 2. Stress (Psicologia) – Teses. 3. Ansiedade – Teses. 4. Habituação (Neuropsicologia) – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Estanislau, Célio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

CDU 159.9.019.43

ANDRÉ WILSON NAZARETH VELOSO

CURSO TEMPORAL E DISTRIBUIÇÃO REGIONAL DA AUTOLIMPEZA
DE RATOS EM RESPOSTA A DIFERENTES ESTRESSORES
AMBIENTAIS

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Análise do Comportamento da Universidade Estadual de Londrina, como cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Célio R. Estanislau
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Netto
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de setembro de 2012.

“Talento é trabalho”
(Roger Nunes, *in memórian*)

VELOSO, André Wilson Nazareth. *Curso temporal e distribuição regional da autolimpeza de ratos em resposta a diferentes estressores ambientais*. 2012. 50p. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), 2012.

RESUMO

A autolimpeza (*grooming*) de roedores é um padrão fixo de ação compartilhado funcionalmente entre várias espécies animais, ocupando uma função prioritária de higienização do corpo. Além disso, o *grooming* tem sido apontado como um tipo de *coping* comportamental envolvido em contingências estressantes e alguns aspectos desse comportamento têm sido abordados na pesquisa de estresse e ansiedade. No entanto, poucos trabalhos têm se dedicado a estudar como as variáveis ambientais modulam o *grooming*. O presente estudo objetivou investigar como estressores ambientais diferentes alteram o *grooming* e quais padrões desse comportamento são formados por essas alterações. Para isso, 40 ratos foram submetidos sequencialmente a cinco testes (Labirinto em Cruz Elevado [LCE], Teste do Enterramento de Bolas-de-Gude [TEB], Extinção Operante [EXT], Contexto do Medo Condicionado [CMC] e Imobilização [P-IM]) conhecidos por seus efeitos estressantes/ansiosogênicos sobre o comportamento. Uma sessão prolongada de 30 minutos foi adotada em todos os testes e os dados foram analisados pelo curso do tempo e distribuição regional do *grooming* (rostral e corporal). As medidas convencionais de cada teste foram observadas em função de fornecer suporte comparativo para as medidas de *grooming*. O *grooming* no LCE e no TEB tendeu a ascender ao longo do tempo, enquanto houve queda da exploração (LCE e TEB), da avaliação de risco (LCE) e do tempo de escavação (*digging* – TEB). Isso permitiu caracterizar a curva ascendente de *grooming* como uma resposta de habituação ao contexto. Adicionalmente, essa curva foi atribuída ao prolongamento de *grooming* corporal ao decorrer da sessão. O *grooming* na EXT foi drasticamente suprimido. Essa supressão do *grooming* foi atribuída a (1) ativação do sistema de inibição comportamental subjacente à frustração provocada pelo não-reforçamento e à (2) permanência das variáveis estressoras (privação de água e contexto frustrante) durante a sessão. O CMC provocou uma alternância constante entre o *congelamento* e o *grooming* durante a sessão. Isso permitiu inferir que esse contexto manteve-se ansiosogênico durante a maior parte do tempo. Em consequência, o CMC bloqueou a ascensão da curva de *grooming* e observou-se que isso foi devido a um atraso /impedimento no prolongamento do *grooming* corporal. A P-IM, apresentou um pico de atividade exploratória e de *grooming* no início da sessão, ambos tendendo ao declínio ao longo do tempo. Como houve um surto agudo de *congelamento* após o pico de exploração, foi inferido que a imobilização deve ter aumentado a aversão à novidade da caixa de observação. Assim como no CMC, o *grooming* foi impedido de ascender. Comparado aos contextos de exposição à novidade sem estresse prévio (i.e., LCE e TEB), o impedimento no prolongamento de *grooming* denota um prejuízo da habituação ao contexto na P-IM. Tomados em conjunto, os resultados mostraram que o *grooming* corporal foi o maior responsável pela variação na duração do *grooming* em resposta aos diferentes contextos. Esses resultados ressaltam a importância de sessões prolongadas para a avaliação do *grooming*, assim como sua utilidade para a investigação da ansiedade e do estresse em resposta ao contexto.

Palavras-chave: Modelos animais. Ansiedade. Habituação. Grooming. Estresse. Curso temporal.

VELOSO, André Wilson Nazareth. *Time course and regional distribution of self-grooming in response to different environmental stressors in rats*. 2012. 50p. Thesis, Behavioral Analysis Post Graduation Program, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), 2012.

ABSTRACT

Rodent grooming is a fixed action pattern functionally shared among several animal species which plays a primary function of body surface care. In addition, the grooming has been considered as a type of behavioral coping involved in stressing situations. Some aspects of this behavior has been discussed in the stress and anxiety research. However, few works have been devoted to study how environmental variables modulate grooming. The objective of the present study was to investigate how different environmental stressors change grooming and what is the direction of that change. Thus, 40 rats were subjected sequentially to five procedures (Elevated Plus Maze [EPM], Marble Burying Test [MBT], Operant extinction [EXT], Contextual Fear Conditioning [CFC] and immobilization [P-IMO]) known by their stressing or anxiogenic effects on behavior. Extended 30-min sessions were adopted in all the tests. Data were analyzed regarding their time course and the regional distribution grooming (rostral or body components). Conventional measures of each test were recorded in order to provide elements for interpreting grooming results. Along the session, grooming in the EPM and MBT increased while exploration (EPM and MBT), risk assessment (EPM) and digging (MBT) declined. Such results suggest that grooming increases can be seen as an instance of contextual habituation. In addition, the changes in the duration of grooming along the session were found to be mostly in virtue of the changes in its body component. Grooming in the EXT was found to be importantly decreased. Such grooming suppression could be attributable to: (1) behavioral inhibition involved in frustration resulting from nonreinforcement and; (2) the stressing variables (water deprivation and frustrating context) being present during the whole session. During the CFC, alternation between freezing and grooming was found along the session. Therefore, it seems that this context kept its aversiveness most of the time. Further, grooming was found to be decreased in this test and that can be explained by the low levels of the body component. In the P-IMO session, exploration and grooming were high in the beginning, and then declined. As high freezing was found to follow the greater exploration period, immobilization apparently increased the aversiveness of the novel box. Just as in the CFC, grooming remained at low levels. As compared to the contexts of novel environment exposure without previous stress (i.e., EPM and MBT), the low grooming levels found in the P-IMO seem to indicate a disturbed habituation process. Together, these results show that the body component account for most of the variation in grooming duration to the different tests. These results also suggest that lengthy sessions can be heuristic in identifying factors regulating grooming and its usefulness in the investigation of context induced anxiety and stress.

Key-words: Animal models. Anxiety. Habituation. Grooming. Stress. Time course.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protótipo do padrão estereotipado de grooming.....	14
Figura 2 - Medidas do Labirinto em Cruz Elevado.....	26
Figura 3 - Medidas do Teste do Enterramento de Bolas.....	27
Figura 4 - Medidas da Extinção Operante.....	29
Figura 5 - Medidas do Contexto do Medo Condicionado.....	30
Figura 6 - Medidas da Observação pós-Imobilização.....	32
Figura 7 - Comparação das durações de grooming rostral, corporal e total.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Experimental	18
Tabela 2 - Comparações entre o <i>grooming</i> rostral ou corporal do mesmo bloco da sessão de testes diferentes.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRF –	Reforçamento contínuo
RPB –	Resposta de pressão à barra
LCE –	Labirinto em Cruz Elevado
TEB –	Teste do Enterramento de Bolas-de-Gude
EXT –	Extinção Operante
CMC –	Contexto do Medo Condicionado
P-IM –	Pós-Imobilização
SAP –	Avaliação de risco (<i>Stretched-attend postures</i>)
ANOVA –	Análise de variância
GABA _A –	Neuroreceptor do subtipo A de ácido gama-aminobutírico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MODELOS ANIMAIS: CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEDIDAS COMPORTAMENTAIS	11
1.2	A AUTOLIMPEZA DE ROEDORES (<i>GROOMING</i>) E SUA FUNCIONALIDADE PARA OS MODELOS ANIMAIS.....	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1	SUJEITOS	18
2.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
2.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	19
2.3.1	Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	19
2.3.2	Teste do Enterramento de Bolas-de-gude (TEB).....	20
2.3.3	Extinção Operante (EXT)	21
2.3.4	Contexto do Medo Condicionado (CMC).....	21
2.3.5	Observação Pós-Imobilização (P-IM).....	22
2.4	MEDIDAS DO <i>GROOMING</i>	23
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4	RESULTADOS	25
4.1	CURSO TEMPORAL DA RESPOSTA A CADA TESTE	25
4.1.1	Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	25
4.1.2	Teste do Enterramento de Bolas de Gude (TEB).....	26
4.1.3	Extinção Operante (EXT)	28
4.1.4	Contexto do Medo Condicionado (CMC).....	29
4.1.5	Observação pós-Imobilização (P-IM).....	31
4.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS DURAÇÕES DE <i>GROOMING</i> DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	33
5	DISCUSSÃO	36
5.1	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	37
5.2	TESTE DO ENTERRAMENTO DE BOLAS DE GUDE (TEB)	38

5.3	EXTINÇÃO OPERANTE (EXT).....	38
5.4	CONTEXTO DO MEDO CONDICIONADO (CMC).....	39
5.5	OBSERVAÇÃO PÓS-IMOBILIZAÇÃO (P-IM).....	40
5.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS ANIMAIS: CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE MEDIDAS COMPORTAMENTAIS

Modelos animais podem ser definidos como preparações experimentais em uma espécie para os propósitos de estudar fenômenos que ocorrem na mesma ou outra espécie (Geyer & Markou, 1995). Um modelo animal de transtornos do comportamento intenta simular ou modelar condições humanas presentes nos transtornos como, por exemplo, a topografia comportamental, uma possível etiologia ou processo neurobiológico envolvido. Apesar disso, nem sempre um modelo é capaz de simular todos os aspectos, e nem é preciso que assim seja para ser considerado válido (Geyer & Markou, 1995; Graeff, 2005a; Hinde, 1977).

Existem critérios para a validação de um modelo que, tendo sido projetado para um propósito de investigação, têm de ser satisfeitos. Os *critérios de validade* mais conhecidos são os de *validade preditiva*, *de construto*, *etiológica*, *convergente*, *discriminante* e *de face* (Geyer & Markou, 1995). Dentre eles, três podem ser destacados (Graeff, 2005a) como os mais importantes: *Previsibilidade* (Validade Preditiva), *Analogia* (Validade de Face) e *Homologia* (Validade de Construto). Os outros critérios terminam por estar envolvidos em segundo plano (“embutidos” aos outros) na construção do modelo. O que não quer dizer que todos têm de ser preenchidos.

Um modelo possui alta *validade preditiva* quando sua medida comportamental sofre efeitos de agentes farmacológicos (1) que são eficazes na atenuação de certas condições psicopatológicas em humanos, ou que (2) agravam tais condições, como também quando (3) não sofre efeitos de fármacos que são conhecidos por serem ineficazes nessas mesmas condições (Graeff, 2005a). Como exemplo, o Labirinto em Cruz Elevado é um modelo bem validado e conhecido de ansiedade. Baseado sobre a tendência de ratos em evitar espaços abertos, o labirinto é contruído no formato de uma cruz deitada, mas erguida do chão o suficiente para evitar que o rato escape. A cruz é formada por dois braços abertos e dois fechados. Os braços fechados tendem a ser mais explorados do que os abertos. Em uma sessão de cinco minutos nesse modelo, drogas ansiolíticas aumentam o tempo gasto nos braços abertos do labirinto. Ao contrário, drogas ansiogênicas reduzem o tempo gasto nesses braços (i.e., o modelo atende as condições 1 e 2 acima mencionadas). Outras drogas não eficazes em combater ansiedade, não surtem efeito sobre o comportamento no modelo (Graeff, 2005b).

Como o critério de validade preditiva exige correspondência entre os efeitos de fármacos tanto em um transtorno quanto no modelo animal, tal critério é frequentemente baseado em *isomorfismo farmacológico* (Geyer & Markou, 1995), isto é, o modelo é validado por ser sensível a drogas distintas, mas com funções semelhantes (e.g., fluoxetina e paroxetina, ambos efetivos na redução de ansiedade em administração crônica).

A *validade de face* (analogia) é obtida quando os comportamentos simulados no modelo são semelhantes aos comportamentos típicos em um transtorno (Geyer & Markou, 1995; Graeff, 2005a). Por exemplo, o modelo do desamparo aprendido possui face similar ao que ocorre com pacientes depressivos. Dado que pacientes tem seus repertórios comportamentais gerais reduzidos e, no modelo animal, os ratos também reduzem seus repertórios gerais (e.g., *congelamento* e baixa mobilidade), pode-se dizer que tal modelo possui validade de face. Mas alguns modelos não se assemelham a qualquer comportamento típico de transtornos e ainda assim são válidos. Este é o caso de modelos de transtornos psicóticos, com os quais reproduzir comportamentos encobertos, como os delírios, ou outros característicos, como paranoia, seria praticamente impossível. Consecutivamente, qualquer comportamento que decline em frequência ou tempo, mediante a introdução de agentes neurolépticos, poderia tornar-se a medida comportamental válida para o modelo. Isto, desde que fármacos conhecidos por elevarem comportamentos psicóticos tenham o efeito de aumentar tal medida comportamental.

Também, um modelo pode apresentar *validade de construto* (homologia). O processo de validação do construto é o mesmo de um procedimento científico geral para o desenvolvimento e testagem de teorias (Geyer & Markou, 1995). Portanto, o construto que baseará o modelo deve ser experimentalmente derivado. Por exemplo, estudos de neuroimagem e lesão implicam o córtex orbito-frontal na fisiopatologia dos comportamentos compulsivos em humanos (Hugo, van Heerden, Zungu-Dirwayi, & Stein, 1999). Se num modelo animal, a lesão do córtex orbital de ratos, correspondente ao córtex orbito-frontal em humanos (Uylings, Groenewegen, & Kolb, 2003), resulta em aumento de comportamentos compulsivos pelo animal, então, o modelo e a condição humana serão homólogos porque possuem similaridade quanto aos mecanismos de indução e sistema neural. O que significa que o modelo terá validade de construto.

Justamente porque um modelo raramente consegue abranger todos os principais critérios de validade (Graeff, 2005a; Geyer & Markou, 1995), pesquisas envolvendo um transtorno não podem depender de um único modelo animal. Isso porque cada

critério de validade atende aspectos específicos do transtorno ou seu tratamento. Desse modo, outros modelos também podem ser usados de comparação para fornecer validade ao modelo construído. Este é o papel dos critérios de *validade convergente* e *validade discriminante*, e são requisitos na validação do construto. Se um modelo animal base é eficaz em medir ansiedade de modo correlato ao outro modelo de comparação que também mede ansiedade, então temos convergência entre os dois modelos e, portanto, o modelo base tem boa validade convergente. Ao contrário, se esse mesmo modelo base é capaz de medir ansiedade, mas não depressão (que é a medida de modelo de comparação), então o modelo base é discriminante do modelo de comparação e, assim, possui boa validade discriminante. Portanto, a validade convergente e discriminante são medidas dependentes das quais pode ser inferida a validade do construto.

Por último, um modelo animal terá *validade etiológica* desde que as condições que induzem o fenômeno no modelo sejam as mesmas que induzem aspectos no transtorno (Geyer & Markou, 1995). Esse critério é estritamente ligado ao de validade de construto. Desde que seja possível identificar a homologia entre o modelo animal e o transtorno em humanos, um construto pode dar pistas sobre a etiologia do transtorno. Um modelo baseado etiológicamente poderia superar qualquer modelo baseado no tratamento (i.e., isomorfismo farmacológico), visto que o próprio modelo direcionaria o tratamento a ser utilizado, e não o contrário (Geyer & Markou, 1995). Contudo, as etiologias dos transtornos do comportamento não estão bem estabelecidas e, por isso, existe uma grande dificuldade em construir um modelo baseado etiológicamente. Como cada modelo intenta investigar aspectos específicos de um transtorno, os critérios de validade serão aplicáveis em função do que o modelo pretende avaliar. Então, um modelo animal válido é aquele capaz de investigar o que ele foi projetado para investigar (Geyer & Markou, 1995).

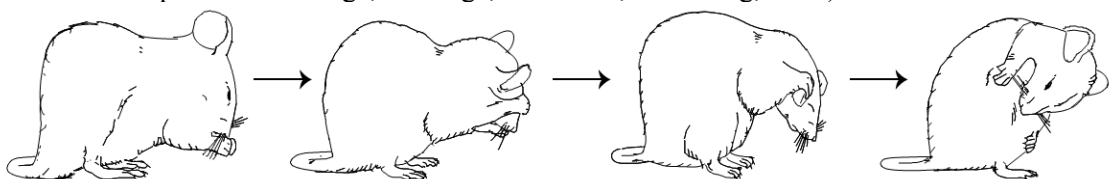
Os modelos animais dividem-se em *comportamentais*, *farmacológicos* e *genéticos* (Man, Hudson, Ashton, & Nutt, 2004), classificados, desta forma, pelo modo com que os comportamentos-alvo, característicos de um transtorno, são induzidos no modelo. Seja por introdução de um fármaco afetando algum sistema neurotransmissor, pela alteração enzimática de algum gene codificador de um sistema ou pela manipulação experimental de variáveis ambientais. Como o comportamento é produto de um processo evolutivo, modelos etológicos têm grande potencial para responder a questões sobre os efeitos bioquímicos e aspectos comportamentais correspondentes a um transtorno (Morrisson & McKinney, 1977). Assim, sendo que a medida etológica é o comportamento próprio de uma espécie, a

generalização entre espécies torna-se possível (Fairbanks, 1977) porque o comportamento estudado num transtorno é, em sua origem, adaptativo do ponto de vista evolutivo (Fairbanks, 1977; Gray & McNaughton, 2000a). O comportamento de limpeza (*cleanliness*) ou mesmo lavagem (*washing*), por exemplo, foi selecionado evolutivamente para muitas espécies ao combater organismos residentes na sujeira, elevando, assim, as probabilidades de sobrevivência. Da mesma forma, a checagem (*checking*) deve ter evitado que muitos filhotes fossem predados. Mas mesmo na ausência aparente de sujeira ou de predadores, tais comportamentos podem ocorrer e serem mantidos. Ainda assim, são evolutivamente adaptativos por estarem prevenindo potenciais acontecimentos perigosos ou aversivos (Gray & McNaughton, 2000a).

1.2 A AUTOLIMPEZA DE ROEDORES (*GROOMING*) E SUA FUNCIONALIDADE PARA OS MODELOS ANIMAIS

O comportamento de *grooming* é um padrão fixo de ação compartilhado funcionalmente entre várias espécies animais. Esse comportamento tem sido observado, por exemplo, em vários mamíferos como nos roedores (Berridge K. C., 1990) e felídeos (Eckstein & Hart, 2000), bem como em artrópodes e em aves, ocupando uma função evolutiva prioritária de “cuidado com a superfície do próprio corpo” (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992).

Figura 1 – Protótipo do padrão estereotipado de grooming: Os quatro desenhos dos ratos estão posicionados na sequência cronológica, da esquerda para a direita, das quatro fases do grooming estereotipado. *Fase 1*: série de fortes movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz. As patas direita e esquerda seguem alternando entre trajetórias de movimentos maiores e menores. *Fase 2*: série de movimentos unilaterais, cada movimento envolvendo uma pata, que alcançam até as vibrissas mistaciais abaixo dos olhos. Os ratos costumam fazer movimentos híbridos das Fases 1 e 2, em que uma pata faz o movimento unilateral da Fase 2, enquanto a outra pata faz um curto movimento elíptico da Fase 1. *Fase 3*: série de movimentos amplos bilaterais feitos simultaneamente com ambas as patas friccionando com a parte superior da cabeça. Patas se estendem por trás em direção ao pescoço e dão a volta para cima, ascendendo o suficiente para passar por cima das orelhas, deslizando juntas, em seguida, em direção à frente do rosto. *Fase 4*: movimentos prolongados de lambidas do corpo (retirado e adaptado de Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005).



Adicionalmente, observou-se em algumas espécies de roedores que, em muitas das vezes, essa “higienização” é executada numa ordem de ações de forma rígida. Isso levou o *grooming* a ser considerado como um fenótipo comportamental estereotipado (Berridge, Fentress, & Parr, 1987; Berridge K. C., 1990). Alguns estudos demonstraram que os roedores tendem a apresentar um conjunto de movimentos sequenciais e rítmicos anatomicamente distribuídos (Berridge K. C., 1990; Berridge, Fentress, & Parr, 1987; Fentress, 1988), seguindo uma combinação de quatro fases (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005) (ver Figura 1).

Em geral, as chances de o *grooming* ser apresentado pelo animal são estocásticas. Em especial, algumas evidências têm mostrado que o *grooming* é um comportamento “auto-facilitado”, no sentido de que é muito mais provável que o animal alterne ou prolongue os diferentes atos de *grooming* se ele já está engajado nesse comportamento. Nesse sentido, um primeiro ato de *grooming* funciona como um estímulo para um próximo ato de *grooming* (Bressers, et al., 1995b). Em termos probabilísticos, uma vez que o animal inicia um episódio de *grooming*, há uma forte tendência de que ele persevere numa fase até fazer uma transição para o elemento comportamental próximo na sequência de *grooming* estereotipada (Bressers, et al., 1995a; Fentress, 1988; Berridge, Fentress, & Parr, 1987), mesmo que algum elemento seja saltado (e.g., dos [1º] movimentos com as patas dianteiras [salta as fricções do rosto e das orelhas] para [2º] as lambidas no corpo).

Para além da modulação periférica, as variações mais estereotipadas de *grooming* parecem ocorrer em função do controle central (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992). Foi demonstrado que camundongos que tiveram suas patas dianteiras amputadas pouco após o nascimento, quando adultos mostraram movimentos característicos de *grooming* facial (movimentação de ombros combinada a movimentos de cabeça e piscadas) similares aos dos camundongos intactos (Fentress, 1973). O que sugere um forte componente endógeno no controle do *grooming*. Isso parece de especial importância para a compreensão dos mecanismos centrais da regulação desse comportamento.

Em particular, o *grooming* pode ser induzido pela administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no núcleo paraventricular hipotalâmico (Gispen & Isaacson, 1981; Isaacson, Hannigan Jr., Brakkee, & Gispen, 1983; Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979a). Também vários outros peptídeos com mecanismos de ação distintos como a vasopressina, a oxitocina, a prolactina, a substância P, o fator de liberação de corticotrofina (CRF), entre outros [ver (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992)] podem induzir *grooming* em

ratos e camundongos. Ademais, essas induções farmacológicas podem mostrar padrões desse comportamento com topografias específicas ao tipo de substância administrada, indicando que diferentes mecanismos neurais estão envolvidos na regulação dos diferentes padrões de *grooming* (Bressers, et al., 1995a; Bressers, et al., 1995b; Greidanus, et al., 1985).

No âmbito dos padrões estereotipados de *grooming*, estudos recentes têm focado sobre as razões pelas quais um episódio é interrompido ou descontinuado (Enginar, Hatipoğlu, & Firtına, 2008; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff & Tuohimaa, 2005a; Kalueff & Tuohimaa, 2005b; Kalueff & Tuohimaa, 2005c) mostrando que investigações desses aspectos podem ser úteis na pesquisa com modelos animais de estresse e ansiedade. Além disso, o *grooming* tem sido considerado como um estilo de *coping* comportamental a desafios estressantes/ansiosogênicos (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992). Nesse contexto, poucos trabalhos atuais têm se dedicado a estudar como o *grooming* responde às variáveis ambientais [e.g., (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005b; Komorowska & Pellis, 2004; van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994)]. Dentre esses poucos, van Erp e cols. (1994) estudaram o curso temporal do *grooming* em resposta a alguns estressores ambientais e observaram que a severidade do estressor mais atrasa que facilita a ocorrência de *grooming*. No entanto, os ratos expostos ao estressor mais severo utilizado naquele estudo (confronto com um coespecífico dominante) fizeram mais *grooming* do seus controle após 20 minutos de tempo decorrido. Isso indica que, mais do que atrasar o *grooming*, o encontro com o coespecífico atrasou o declínio de *grooming* como observado no ratos controle. Adicionalmente, o *grooming* induzido por novidade é conhecido por aumentar gradualmente ao decorrer do tempo [e.g., (Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979a; Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979b; van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994)] e esse fenômeno foi sugerido como indicador da habituação ou redução de excitação (*dearousal*) em resposta à novidade (Komorowska & Pisula, 2003). Desse modo, esses achados concordam com a ideia de que o *grooming* pode emergir como uma forma de *coping* a eventos estressantes.

Portanto, o presente estudo objetivou investigar como diferentes tipos de estressores alteram o *grooming* e quais padrões desse comportamento são formados por essas alterações. Dado o fato de que diferentes estressores provocam aumento no *grooming*, fica a pergunta sobre se as características do aumento são semelhantes ou diferentes a depender do tipo de estressor. A fim de responder a essa pergunta, o presente trabalho usou estressores envolvendo diferentes processos comportamentais, a saber: exploração de ambiente novo,

frustração, medo e ansiedade potencializada por estresse. Para tanto, foram utilizados cinco conhecidos paradigmas-teste (i.e., Labirinto em Cruz Elevado [LCE], Teste do Enterramento de Bolas-de-Gude [TEB], Extinção Operante [EXT], Contexto do Medo Condicionado [CMC] e Imobilização [P-IM]) conhecidos por seus efeitos estressantes/ansiosgênicos sobre o comportamento. Uma sessão prolongada de 30 minutos foi adotada em todos os testes e os dados foram analisados pelo curso do tempo e distribuição regional do grooming (i.e., *grooming* rostral e corporal). As medidas próprias de cada teste foram observadas em função de fornecer suporte comparativo para as medidas de grooming.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SUJEITOS

Quarenta ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos pesando 250 – 300 gramas foram obtidos de uma colônia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Eles foram mantidos no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC/CCB) dessa mesma universidade, sob um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes às 7:00 h) e temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C. Foram colocados 5 ratos por gaiola plástica (40 cm x 34 cm x 17 cm) forrada com cepilho. Comida e água estiveram disponíveis *ad libitum*. Nenhuma manipulação relativa ao experimento ocorreu antes de pelo menos uma semana de habituação dos animais ao biotério. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Psicologia Experimental e Psicobiologia (PGAC/CCB/UEL – sala 256). Todo o procedimento experimental foi conduzido de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, por sua vez, baseadas nas recomendações do *US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (CEUA/UEL 68/12, processo nº 29267.2001.20).

Tabela 1 – Delineamento Experimental.

Período 1		FASE 1			FASE 2		Período 2	
		Sequência			----->			
Ratos 1 ao 20	Treino	1	Treino RPB	Testagem	LCE	+ 7 dias	Ratos 21 ao 40	Repetição do mesmo processo anterior
		2	+ 2 dias		TEB	+ 7 dias		
		3	CRF		EXT	+ 7 dias		
		4	+ 7 dias		CMC	+ 7 dias		
		5	Início FASE 2		P-IM			

Siglas: RPB = resposta de pressão à barra; CRF = Reforçamento Contínuo; LCE = labirinto em cruz elevado; TEB = teste do enterramento de bolas-de-gude; EXT = extinção operante; CMC = contexto do medo condicionado; P-IM = observação pós-imobilização.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental está sumarizado na Tabela 1. A pesquisa foi conduzida em duas fases consecutivas. A Fase 1 corresponde a um período de treinamento e a Fase 2 corresponde ao período de experimentação. Essas duas fases consecutivas foram

conduzidas utilizando 20 ratos por vez. Após o término da Fase 2 (com os primeiros 20 ratos), uma nova etapa foi iniciada, utilizando-se os 20 ratos restantes submetidos ao mesmo tratamento.

Na Fase 1, o comportamento dos ratos foi modelado, sob privação de água por 48 horas, à resposta de pressão à barra em uma Caixa de Skinner padrão (*Eltrones*, modelo ELT – 02), em função de atender a um dos procedimentos da Fase 2 (i.e., a Extinção Operante). Dois dias após a modelagem, sob a mesma privação, foi realizada uma sessão de reforçamento contínuo (CRF) da resposta de pressão à barra, encerrada após o rato ter sido saciado (i.e., após dez minutos decorridos sem que o rato pressionasse a barra). Uma semana após o término desse procedimento, a Fase 2 foi iniciada.

Na Fase 2, cinco testes foram utilizados na seguinte sequência: 1º – Labirinto em Cruz Elevado (LCE), 2º – Teste do Enterramento de Bolas-de-gude (TEB), 3º – Extinção Operante (EXT), 4º – Contexto do Medo Condicionado (CMC) e 5º – Imobilização (P-IM). Os mesmos ratos foram submetidos a todos os testes. Cada teste foi conduzido em quatro dias, utilizando 5 ratos por dia (5 ratos x 4 dias). Foram adotados intervalos de sete dias entre os testes. Os experimentos foram realizados entre 14 e 18 horas em uma sala preparada para cada teste (com iluminação de 168 lux aproximadamente). Com exceção do LCE, os ratos foram aclimatados por uma hora antes do início do experimento na própria sala de testagem (a aclimação anterior ao LCE foi feita no ambiente da antessala da sala de testagem). Ao final de cada sessão, o rato testado foi levado para outra gaiola plástica (40 cm x 34 cm x 17 cm) e mantido distante dos ratos que ainda não tinham sido testados para evitar a transmissão de pistas olfativas de estresse. Todas as sessões dos testes foram gravadas com uma câmera filmadora digital.

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

2.3.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um aparato de madeira constituído por quatro braços erguidos a 50 centímetros do chão formando uma cruz. Dois braços do labirinto (50 cm x 10 cm) são fechados com planos perpendiculares (40 cm) às bordas do braço. Os dois outros braços são abertos (50 cm x 10 cm) e bordeados com acrílico até a altura de 01 cm. No centro entre os braços, há um quadrado plano (10 cm x 10 cm) ligando os braços abertos e

fechados. Cada rato foi colocado no quadrado central com a face voltada para um dos braços fechados e filmados por 30 minutos com uma câmera posicionada a 2.4 metros do chão.

As medidas registradas foram 1) *Frequência e Tempo de Entradas nos Braços*: quando o rato entra com quatro patas dentro de um braço fechado ou aberto. As entradas são dadas por terminadas quando o rato, ao sair de um braço, coloca as quatro patas dentro do quadrado central; 2) *Frequência da Avaliação de risco (stretched-attend postures – SAP)*: quando o rato estica o corpo mantendo as patas traseiras fixadas no mesmo local e retorna a posição de origem; 3) *Grooming*: ver sessão “Medidas do *Grooming*”.

2.3.2 Teste do Enterramento de Bolas-de-gude (TEB)

O TEB consiste em expor o rato a uma gaiola nova com serragem até a altura de 05 cm e bolas-de-gude espalhadas por sobre a mesma. As bolas-de-gude enterradas têm sido consideradas como um marcador de ansiedade em roedores, especialmente porque o número de bolas enterradas é reduzido após um tratamento ansiolítico (Broekkamp, Rijk, Joly-Gelouin, & Lloyd, 1986; Njung'e & Handley, 1991). Contudo, a contagem de bolas ao longo da sessão mostra-se pouco informativa para os propósitos do presente trabalho. Alternativamente, as bolas-de-gude enterradas têm sido consideradas um marcador da intensidade do comportamento de escavação (*digging*) em camundongos (Gyertyán, 1995; Thomas, et al., 2009). Em concordância, algo similar foi observado nos ratos do nosso experimento, sendo que, em uma análise preliminar, o total de bolas enterradas obteve altas correlações com os padrões de escavação (Correlação de Spearman [$n = 40$]: bolas enterradas vs tempo de escavação: $r = 0,808$; $p < 0,01$ – bolas enterradas vs frequência de escavação: $r = 0,789$; $p < 0,01$ – frequência vs tempo de escavação: $r = 0,911$; $p < 0,01$). Dada a alta consistência interna entre as medidas do TEB, o tempo de escavação foi adotado como marcador padrão do efeito ansiogênico do teste.

Os ratos foram retirados de suas gaiolas e colocados individualmente em uma gaiola plástica (17 cm x 28 cm x 12 cm) forrada com cinco centímetros de maravalha e com 8 bolas de gude (2,5 cm de diâmetro) distribuídas em sua área. A sessão foi filmada com uma câmera posicionada a 2.4 metros do chão durante 30 minutos. Após isso, os ratos foram devolvidos as suas gaiolas. As categorias comportamentais mensuradas foram: 1) *Número de bolas-de-gude enterradas*: ao final da sessão, as bolas não cobertas pela serragem foram contadas e subtraiu-se pelo número total de bolas dispostas no início da sessão (e.g.; 8 [bolas

totais] – 3 [bolas descobertas] = 5 [bolas enterradas]); 2) *Frequência e Tempo de Escavação (digging)*: mover a maravalha com as patas; 3) *Locomoção*: número de quadrantes cruzados (subdivisão do espaço da caixa em quatro quadrantes); 4) *Grooming*: ver sessão “Medidas do *Grooming*”.

2.3.3 Extinção Operante (EXT)

O procedimento de extinção operante consiste em suspender o reforçamento de um comportamento previamente fortalecido (i.e., pressão à barra não mais resulta em liberação de água). Os ratos, previamente privados de água por 48 horas, foram retirados individualmente de suas gaiolas e colocados em uma Caixa de Skinner padrão (*Eltrones*, modelo ELT – 02) suspensa a 0.5 metros do chão. Para favorecer a observação detalhada, um espelho foi adaptado debaixo da caixa de modo a refletir o interior da Caixa de Skinner através de seu fundo gradeado. A sessão foi filmada com uma câmera posicionada frontalmente a um metro de distância. A sessão iniciou em um esquema de reforçamento contínuo de 15 pressões à barra (CRF 15). Atingida a décima quinta resposta de pressão reforçada, a barra foi desativada (extinção operante). A partir de então, um período de 30 minutos foi utilizado para observação. Após isso, os sujeitos foram retornados as suas gaiolas. As categorias comportamentais mensuradas foram 1) *Taxa de resposta de pressão à barra* e 2) *Grooming*: ver sessão “Medidas do *Grooming*”.

2.3.4 Contexto do Medo Condicionado (CMC)

O paradigma-teste é referente ao procedimento de Condicionamento Pavloviano de Medo Contextual (Jaffard, Bontempi, & Menzaghi, 2001). Esse procedimento foi realizado na mesma Caixa de Skinner utilizada na “Extinção Operante” para evitar o efeito de ambiente novo (foram usados os mesmos aparatos de espelho e filmagem descritos no procedimento anterior).

Duas sessões foram realizadas. Na primeira sessão, os ratos foram colocados na caixa e foram disponibilizados dez minutos para exploração livre. Após esse intervalo, um choque elétrico (0,6 mA, 1 s) foi liberado e o sujeito permaneceu mais 30 minutos na caixa. Após isso, os sujeitos retornaram as suas gaiolas. A segunda sessão aconteceu 24 horas após a primeira sessão. Os ratos foram novamente colocados na caixa,

mas nenhum choque foi liberado. Os ratos permaneceram por 30 minutos no equipamento e retornaram as suas respectivas gaiolas.

As categorias comportamentais mensuradas foram 1) *Tempo de Congelamento*: estado de paralisação ou imobilidade; 2) *Frequência de Levantar-se*: quando o rato ergue-se apoiado sobre os membros traseiros e 3) *Locomoção*: número de quadrantes cruzados (subdivisão do espaço da caixa em quatro quadrantes); 4) *Grooming*: ver sessão “Medidas do *Grooming*”.

2.3.5 Observação Pós-Imobilização (P-IM)

Esse procedimento é uma adaptação de uma metodologia de estresse agudo induzido por imobilização de movimentos (Yamada, Santo-Yamada, & Wada, 2003). No entanto, nosso método de imobilização difere quanto à estrutura geométrica do aparato imobilizador. No referido estudo, os autores utilizaram um caixa justa feita de tela de arame (*wire mesh cage*). Já nesta pesquisa, utilizou-se um imobilizador feito de tela de arame em formato cônico, porém moldável ao corpo do rato. Isso permitiu ajustar de maneira em que o animal não pôde girar em torno de si mesmo e nem se mover.

Imediatamente após trinta minutos de imobilização, o rato foi colocado em uma caixa de vidro transparente (30 cm x 30 cm x 60 cm) suspensa a 0,5 m do chão para o período de 30 minutos de observação. Essa caixa de vidro foi vedada em três laterais com papel fosco de coloração bege. A quarta lateral e o fundo foram deixados descoberta para a filmagem. A sessão foi filmada com uma câmera posicionada a 01 m de distância com a lente voltada para frente da caixa de vidro. Assim como nos dois procedimentos anteriores, um espelho foi adaptado debaixo da caixa de vidro.

As categorias comportamentais mensuradas foram 1) *Tempo de Congelamento*: estado de paralisação ou congelamento; 2) *Frequência de Levantar-se*: quando o rato ergue-se apoiado sobre os membros traseiros; 3) *Locomoção*: número de quadrantes cruzados (subdivisão do espaço da caixa em quatro quadrantes); 4) *Grooming*: ver sessão “Medidas do *Grooming*”.

2.4 MEDIDAS DO *GROOMING*

O comportamento de *grooming* foi mensurado em todos os testes quanto a sua frequência e tempo. Duas categorias de *grooming* foram criadas (*grooming* rostral e *grooming* corporal) referindo-se às regiões do corpo onde o animal se limpa. Assim, as quatro fases do padrão de ação do *grooming* (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005) foram distribuídas para compor essas duas categorias (como descritas no trabalho de Komorowska & Pellis, 2004):

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

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

Parar qualquer dessas ações de *grooming* (i.e., não *grooming*) foi considerado como uma interrupção e marcado quanto à frequência e ao tempo. Um episódio de *grooming* foi, portanto, composto pela soma do tempo de *grooming* rostral, de *grooming* corporal e de interrupções menores do que 5 segundos. Interrupções maiores do que 5 segundos marcaram um novo episódio de *grooming*. O tempo total de *grooming* foi obtido pela soma do tempo de todos os episódios.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de se estudar o curso temporal das respostas comportamentais aos testes, os 30 min de cada sessão foram divididos em seis blocos com duração de 05 min. Uma análise preliminar dos dados foi realizada para verificar se os mesmos seguiam uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov). Para analisar os dados divididos por “Blocos da Sessão”, foi utilizado o teste de Friedman, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn, quando os dados não seguiram uma distribuição normal. Para os dados normais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a um fator para medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. O teste pareado de Wilcoxon foi utilizado para a comparação de pares de dados não normais. O teste *t* pareado de Student foi utilizado para a comparação de pares de dados normais. Para todos os casos, foi adotado um intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

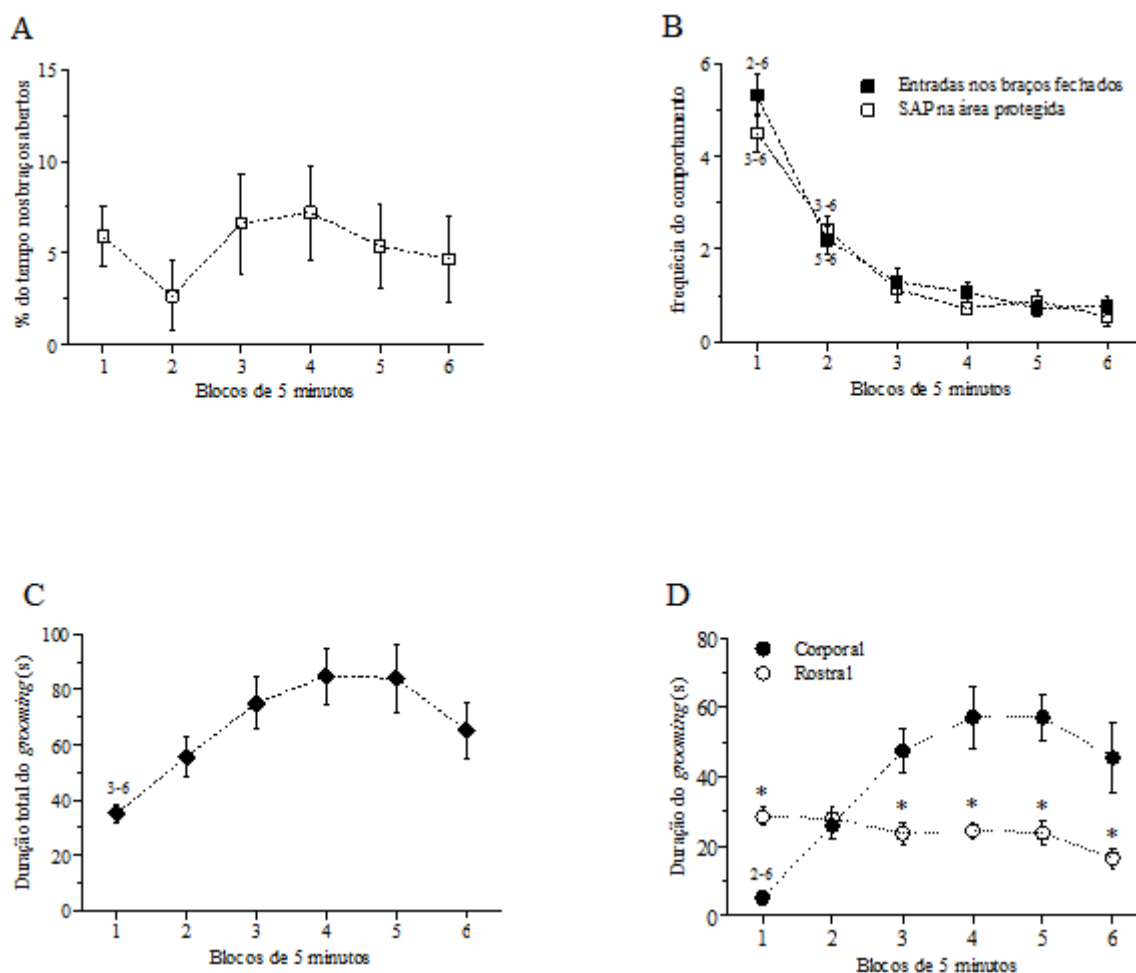
4.1 CURSO TEMPORAL DA RESPOSTA A CADA TESTE

4.1.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os resultados obtidos no LCE estão representados na Figura 2. Apenas metade dos ratos saíram para os braços abertos, provavelmente como um efeito do procedimento anterior (Hogg, 1996) de modelagem de resposta de pressão à barra. Portanto, a exploração dos braços abertos não foi utilizada como medida padrão de ansiedade. O teste de Friedman revelou diferenças significativas entre blocos da sessão quanto à frequência de entradas nos braços fechados ($Fr = 99,64$; $p < 0.0001$) e quanto à frequência de SAP na área protegida ($Fr = 100,7$; $p < 0.0001$). Análise *post hoc* mostrou que a frequência de entradas nos braços fechados no Bloco 1 foi maior do que todos os outros blocos, seguido pelo Bloco 2 que foi maior do que os Blocos 5 e 6. A frequência de SAP na área protegida nos Blocos 1 e 2 foi maior do que nos Blocos 3, 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos (Figura 2B). Nenhum efeito significativo do bloco da sessão foi encontrado sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos (Figura 2A).

A análise de variância a um fator (ANOVA) para medidas repetidas revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração total do *grooming* ($F_{[4,604]} = 5,195$; $p < 0.001$). A análise *post hoc* mostrou que o Bloco 1 obteve uma menor duração do que nos Blocos 3, 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão (Figura 2C). O teste de Friedman revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração do *grooming* corporal ($Fr = 45,27$; $p < 0.0001$), mas não sobre a duração do *grooming* rostral ($Fr = 10,67$; $p = 0.0584$). A análise *post hoc* mostrou que a duração do *grooming* corporal no Bloco 1 é maior do que nos Blocos 2, 3, 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão. Adicionalmente, o teste pareado de Wilcoxon mostrou que a duração do *grooming* corporal foi menor do que a duração do *grooming* rostral no Bloco 1 ($W = 814,0$; $p < 0,0001$) e maior no Bloco 3 ($W = -449,0$; $p < 0.0012$), no Bloco 4 ($W = -539,0$; $p < 0.0001$), no Bloco 5 ($W = -523,0$; $p < 0.0001$) e no Bloco 6 ($W = -425,0$; $p < 0.0003$) (Figura 2D).

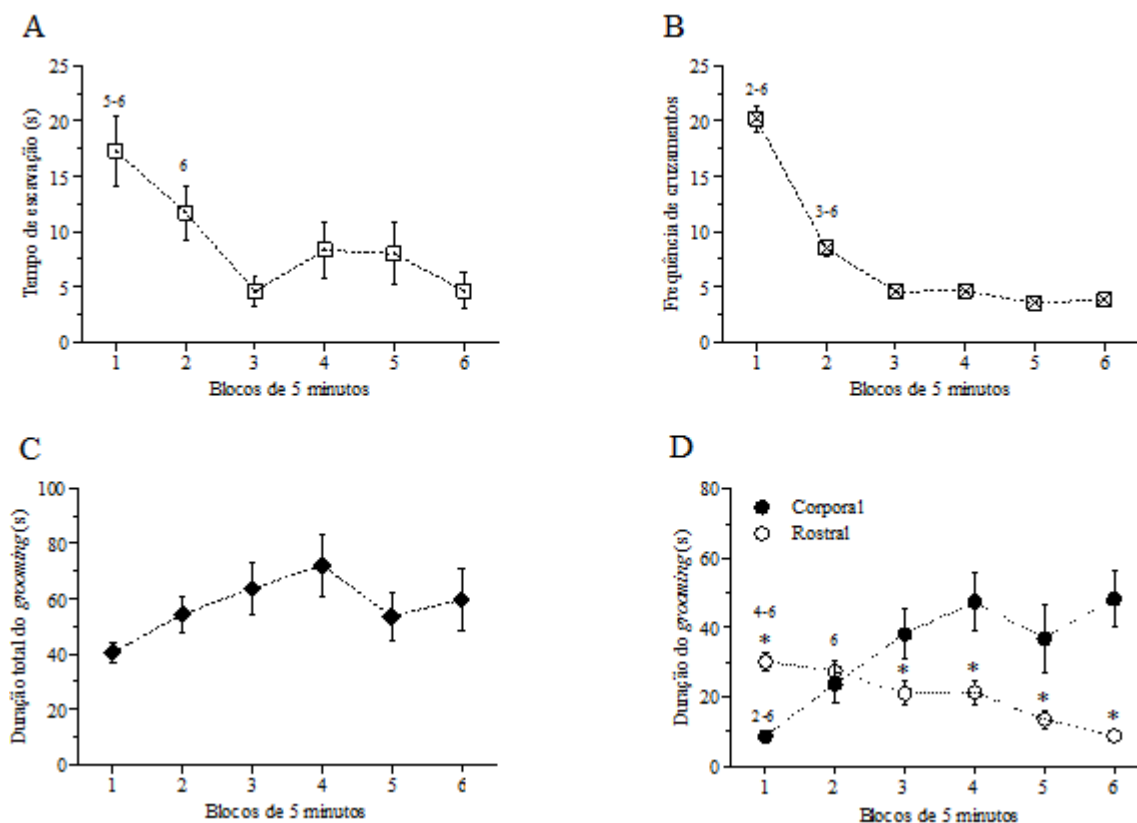
Figura 2 – *Medidas do Labirinto em Cruz Elevado*. O eixo x descreve o tempo total da sessão dividido em seis blocos de 5 minutos. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). ²⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 2, 3, 4, 5 e 6; ³⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 3, 4, 5 e 6; ⁵⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 5 e 6; (Com exceção da duração total do *grooming* [Gráfico 2C – teste *post hoc* de Newman-Keuls], todas as outras medidas foram comparadas pelo teste *post hoc* de Dunn); *, $p < 0.05$ comparado ao *grooming* corporal no mesmo Bloco (teste pareado de Wilcoxon).



4.1.2 Teste do Enterramento de Bolas de Gude (TEB)

Os resultados obtidos no TEB estão representados na Figura 3. O teste de Friedman revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre o tempo de escavação ($Fr = 30,54$; $p < 0.001$). A análise *post hoc* mostrou que o tempo de escavação no Bloco 1 foi maior do que no Bloco 5 e 6, e que no Bloco 2 foi maior do que no Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os outros blocos (Figura 3A).

Figura 3 – *Medidas do Teste do Enterramento de Bolas*. O eixo x descreve o tempo da sessão de 30 minutos dividido em seis Blocos de 5 minutos. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). ²⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 2, 3, 4, 5 e 6; ³⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 3, 4, 5 e 6; ⁴⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 4, 5 e 6; ⁵⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 5 e 6; ⁶, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 6 (Com exceção do tempo de escavação [Gráfico 3A – teste *post hoc* de Newman-Keuls], todas as outras medidas foram comparadas pelo teste *post hoc* de Dunn); *, $p < 0.05$ comparado ao *grooming* corporal no mesmo Bloco (teste pareado de Wilcoxon).



A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre o número de cruzamentos ($F_{[119,3]} = 5,195$; $p < 0.0001$). A análise *post hoc* mostrou que os cruzamentos foram maiores no Bloco 1 do que em todos os outros blocos, e no Bloco 2 do que nos Blocos 3, 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os outros blocos (Figura 3B).

O teste de Friedman também revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração do *grooming* corporal ($Fr = 27,71$; $p < 0.0001$) e rostral ($Fr = 39,70$; $p < 0.0001$), mas não sobre a duração total do *grooming* ($Fr = 1,465$; $p = 0.9170$). A análise *post hoc* mostrou que a duração do *grooming* corporal foi menor no Bloco 1 do que nos outros blocos. A duração do *grooming* rostral foi maior no Bloco 1 do que nos Blocos 4, 5 e 6, e no

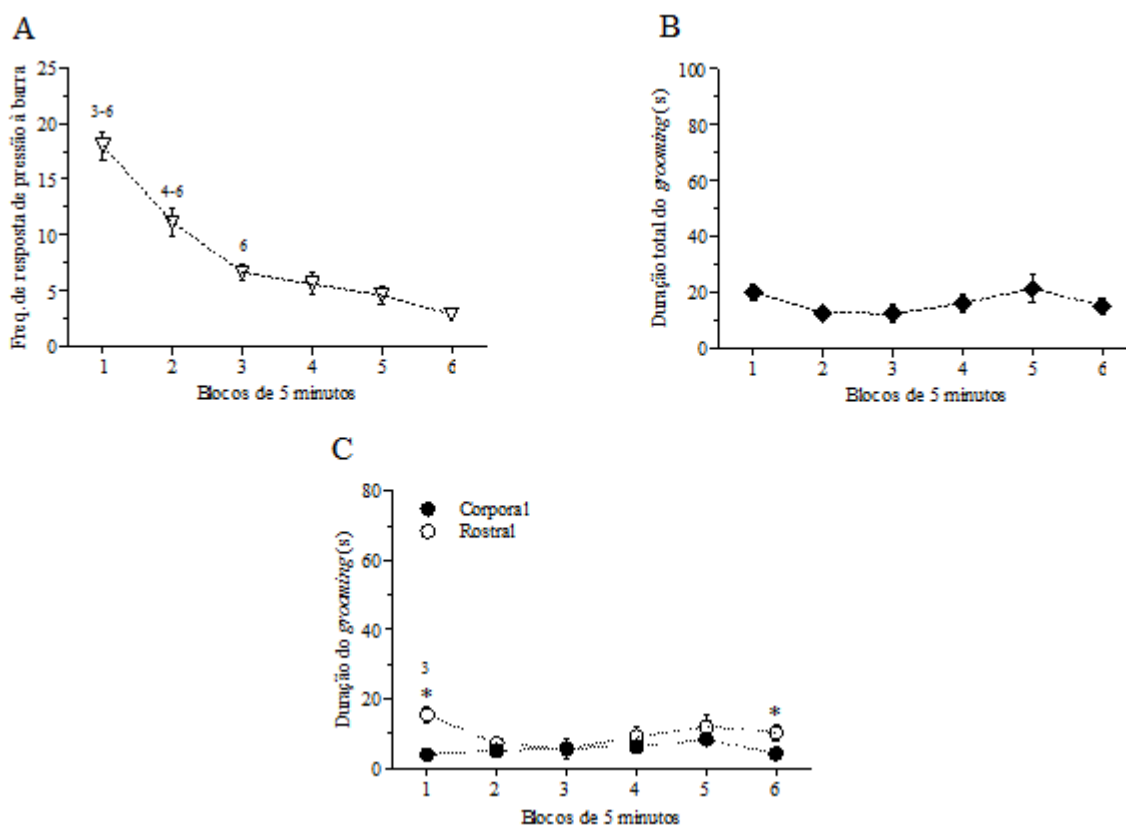
Bloco 2 foi maior somente do que no Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os outros blocos. Adicionalmente, o teste pareado de Wilcoxon mostrou que a duração do *grooming* corporal foi menor do que a duração do *grooming* rostral no Bloco 1 ($W = 714,0$; $p < 0.0001$) e maior no Bloco 3 ($W = -358,0$; $p < 0.01$), no Bloco 4 ($W = -352,0$; $p < 0.01$), no Bloco 5 ($W = -471,0$; $p < 0.0001$) e no Bloco 6 ($W = -450,0$; $p < 0.0001$) (Figura 3D).

4.1.3 Extinção Operante (EXT)

Os resultados obtidos na EXT estão representados na Figura 4. O teste de Friedman apontou efeito significativo do bloco da sessão sobre a frequência de resposta de pressão à barra ($Fr = 102,8$; $p < 0.0001$). A análise *post hoc* mostrou que as pressões à barra no Bloco 1 foram mais frequentes do que nos Blocos 3, 4, 5 e 6. O Bloco 2 apresentou uma frequência maior do que nos Blocos 4, 5, 6. A frequência de resposta no Bloco 3 foi maior apenas do que no Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos (Figura 4A).

O teste de Friedman revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração do *grooming* rostral ($Fr = 19,19$; $p < 0,01$), mas não sobre a duração do *grooming* corporal ($Fr = 7,986$; $p = 0.1570$) nem sobre a duração total do *grooming* ($Fr = 6,594$; $p = 0.2526$). A análise *post hoc* mostrou que a duração do *grooming* rostral no Bloco 1 foi maior apenas do que o Bloco 3. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão. Adicionalmente, o teste de Wilcoxon mostrou que a duração do *grooming* corporal foi menor do que a duração do *grooming* rostral no Bloco 1 ($W = 492,0$, $p < 0.0001$) e no Bloco 6 ($W = 184,0$; $p < 0.05$) (Figura 4C).

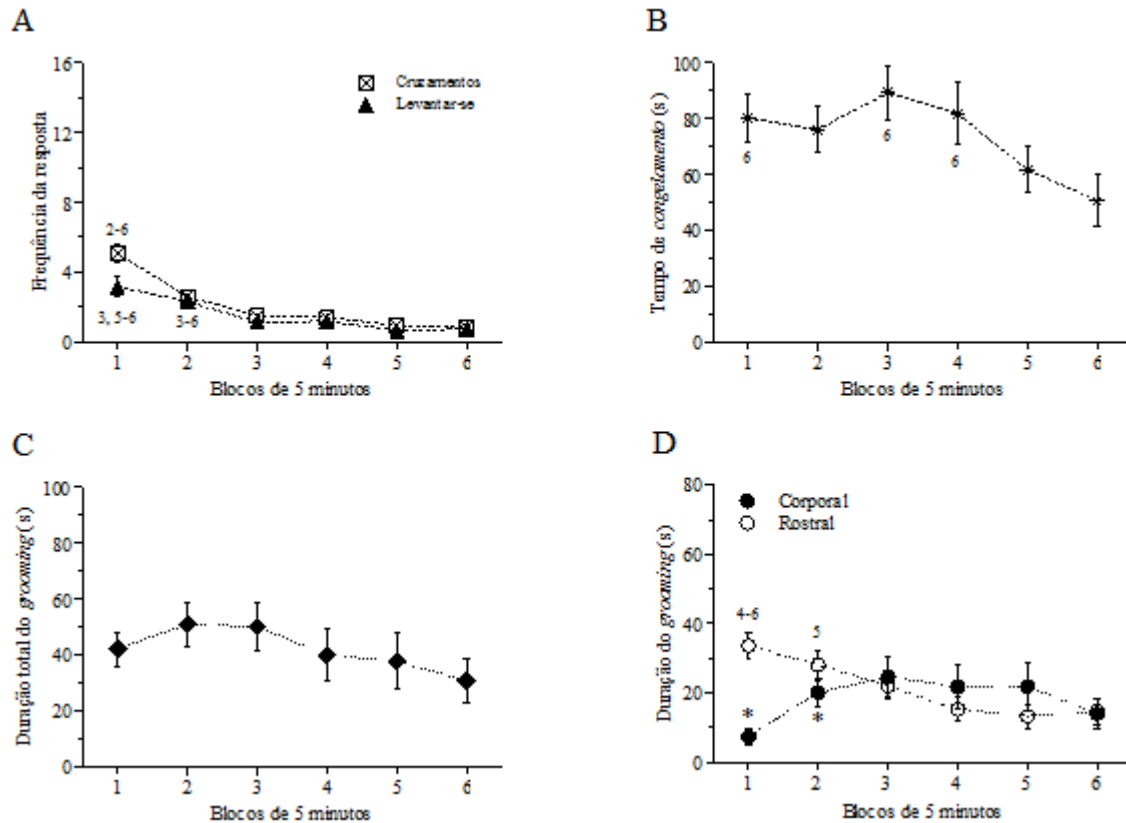
Figura 4 – *Medidas da Extinção Operante*. O eixo x descreve o tempo da sessão dividido em seis blocos de 5 minutos. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). ³, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 3; ³⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 3, 4, 5 e 6; ⁴⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 4, 5 e 6; ⁶, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 6 (teste *post hoc* de Dunn); *, $p < 0.05$ comparado ao *grooming* corporal no mesmo Bloco (teste pareado de Wilcoxon).



4.1.4 Contexto do Medo Condicionado (CMC)

Os resultados obtidos no CMC estão representados na Figura 5. O teste de Friedman revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a frequência de cruzamentos ($Fr = 87.80$; $p < 0.0001$) e sobre a frequência de *levantar-se* ($Fr = 49.43$, $p < 0.0001$). A análise *post hoc* mostrou que a frequência de cruzamentos no Bloco 1 foi maior do que em todos os outros blocos. A frequência de *levantar-se* no Bloco 1 foi maior do que os Blocos 3, 5 e 6, e no Bloco 2 foi maior do que nos Blocos 3, 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos (Figura 5A).

Figura 5 – *Medidas do Contexto do Medo Condicionado*. O eixo x descreve o tempo da sessão de 30 minutos dividido em 6 Blocos. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). ²⁻⁶ $p < 0.05$ comparado aos Blocos 2, 3, 4, 5 e 6; ^{3, 5-6} $p < 0.05$ comparado aos Blocos 3, 5 e 6; ⁴⁻⁶ $p < 0.05$ comparado aos Blocos 4, 5 e 6; ⁵ $p < 0.05$ diferente do Bloco 5; ⁶ $p < 0.05$ diferente do Bloco 6; (com exceção do tempo de *congelamento* [Gráfico 5B – teste *post hoc* de Newman-Keuls], todas as outras medidas foram comparadas pelo teste *post hoc* de Dunn); *, $p < 0.05$ comparado ao *grooming* rostral no mesmo Bloco (teste pareado de Wilcoxon).



A ANOVA para medidas repetidas detectou efeito significativo do bloco da sessão sobre o tempo de *congelamento* ($F_{[3,365]} = 5,195$; $p < 0.01$). A análise *post hoc* mostrou que os Blocos 1, 3 e 4 foram maiores do que o Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos (Figura 5B).

O teste de Friedman apontou para efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração total do *grooming* ($Fr = 14,02$; $p < 0.05$), embora o teste *post hoc* não tenha encontrado diferenças entre os blocos (Figura 5C). O teste de Friedman também revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração do *grooming* rostral ($Fr = 34,18$; $p < 0.0001$) e sobre a duração do *grooming* corporal ($Fr = 14,67$; $p < 0.05$). Embora o teste *post hoc* não tenha mostrado diferenças significantes entre os blocos quanto a duração do

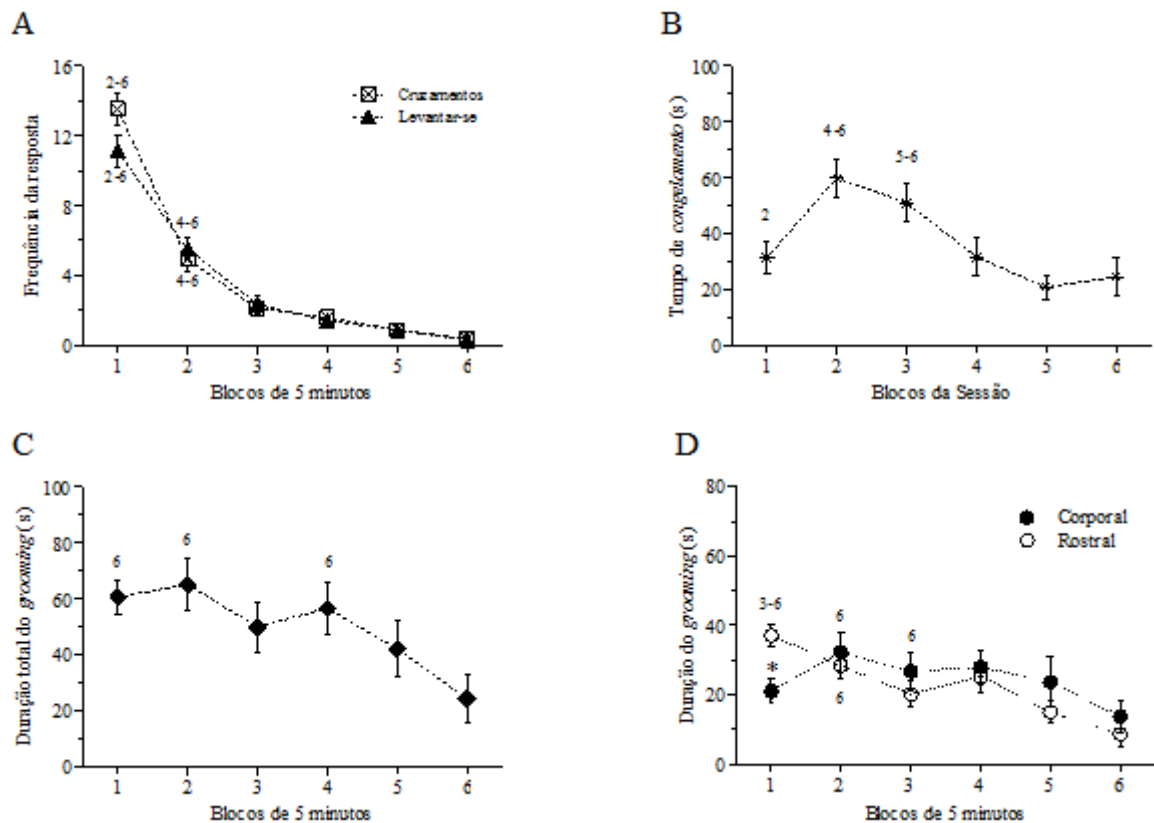
grooming corporal, quanto à duração do *grooming* rostral o Bloco 1 foi maior do que os Blocos 4, 5 e 6. O Bloco 2 foi maior apenas do que o Bloco 5. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos. Adicionalmente, o teste de Wilcoxon mostrou que a duração do *grooming* corporal foi menor do que a duração do *grooming* rostral no Bloco 1 ($W = 687,0$; $p < 0.0001$) e no Bloco 2 ($W = 237,0$; $p < 0.05$) (Figura 5D).

4.1.5 Observação pós-Imobilização (P-IM)

Os resultados obtidos na P-IM estão representados na Figura 6. O teste de Friedman revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a frequência de cruzamentos ($Fr = 133,8$; $p < 0.0001$) e sobre a frequência de *levantar-se* ($Fr = 117,9$; $p < 0.0001$). Tanto para a frequência de cruzamentos quanto para a frequência de *levantar-se*, a análise *post hoc* mostrou que o Bloco 1 foi maior do que os Blocos 2, 3, 4, 5 e 6, e que o Bloco 2 foi maior do que os Blocos 4, 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão (Figuras 6A).

O teste de Friedman detectou efeito significativo do bloco da sessão sobre o tempo em *congelamento* ($Fr = 46,74$; $p < 0.0001$). A análise *post hoc* mostrou que o Bloco 1 foi menor do que o Bloco 2. O Bloco 2 foi maior do que os Blocos 4, 5 e 6. O Bloco 3 foi maior do que os Blocos 5 e 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão (Figura 6B).

Figura 6– *Medidas da Observação pós-Imobilização*. O eixo x descreve o tempo da sessão de 30 minutos dividido em 6 Blocos. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). ², $p < 0.05$ comparado ao Bloco 2; ²⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 2, 3, 4, 5 e 6; ³⁻⁶, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 3, 4, 5 e 6; ⁴⁻⁶, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 4, 5 e 6; ⁵⁻⁶, $p < 0.05$ comparado aos Blocos 5 e 6; ⁶, $p < 0.05$ comparado ao Bloco 6 (teste post hoc de Dunn); *, $p < 0.05$ comparado ao *grooming* rostral no mesmo Bloco (teste pareado de Wilcoxon).

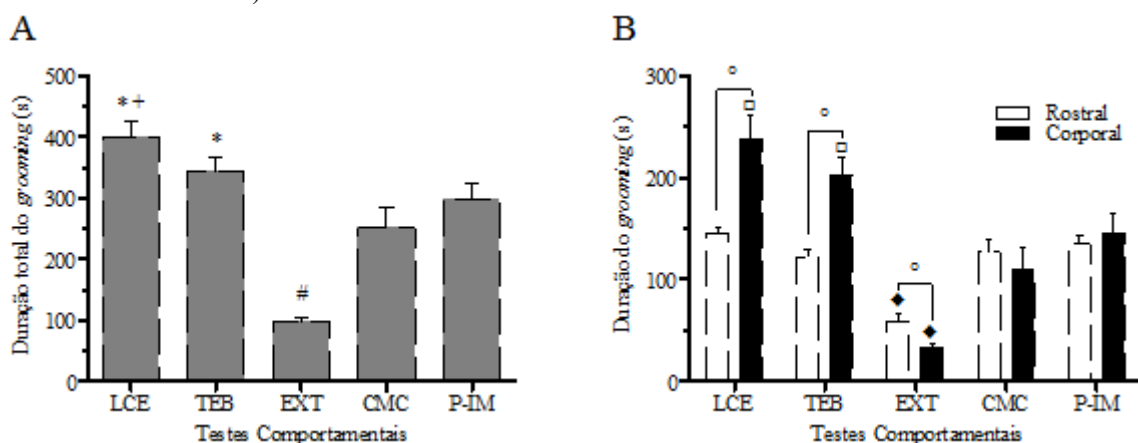


O teste de Friedman apontou para efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração total do *grooming* ($Fr = 29.20$; $p < 0.0001$). A análise *post hoc* mostrou que os Blocos 1, 2 e 4 foram maiores apenas do que o Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros blocos da sessão (Figura 6C). O teste de Friedman também revelou efeito significativo do bloco da sessão sobre a duração do *grooming* rostral ($Fr = 44.14$; $p < 0.0001$) e sobre a duração do *grooming* corporal ($Fr = 18.02$; $p < 0.01$). Quanto a duração do *grooming* rostral, a análise *post hoc* mostrou que o Bloco 1 foi maior do que os Blocos 3, 4, 5 e 6, e que o Bloco 2 foi maior apenas do que o Bloco 6. Quanto a duração do *grooming* corporal, a análise *post hoc* mostrou que os Blocos 2 e 4 foram maiores do que o Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre os outros blocos da sessão. Adicionalmente, o teste pareado de Wilcoxon mostrou que a duração do *grooming* corporal

foi menor do que a duração do *grooming* rostral apenas no Bloco 1 ($W = 614,0$; $p < 0.0001$) (Figura 6D).

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS DURAÇÕES DE *GROOMING* DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Figura 7 – *Comparação das durações de grooming rostral, corporal e total.* O eixo x descreve os cinco testes comportamentais utilizados: Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Teste do Enterramento de Bolas de Gude (TEB), Extinção Operante (EXT), Contexto do “Medo Condicionado” (CMC) e Observação pós-Imobilização (P-IM). Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.) da (A) duração total do *grooming* e da (B) duração do *grooming* rostral e corporal em cada teste ($n=40$). No gráfico 7A, *, $p < 0.05$ comparado à EXT e CMC; +, $p < 0.05$ comparado à P-IM; #, $p < 0.05$ comparado à todos os testes (teste *post hoc* de Newman-Keuls). No gráfico 7B, ♦, $p < 0.05$ comparado ao mesmo elemento de *grooming* em todos os outros testes; □, $p < 0.05$ comparado ao mesmo elemento de *grooming* no CMC e no P-IM (teste *post hoc* de Newman-Keuls); °, $p < 0.05$ comparado ao Rostral do mesmo teste (LCE e TEB – teste *t*; EXT – teste de Wilcoxon).



A Figura 7 apresenta a (A) duração total do *grooming* e a (B) duração do *grooming* rostral e corporal. A análise de variância a um fator (ANOVA) para medidas repetidas revelou efeito significativo do tipo de teste sobre a duração total do *grooming* ($F_{[24,99]}=4,156$; $p < 0.0001$). A análise *post hoc* detectou que o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) obteve um resultado maior do que os outros testes, com exceção do Teste do Enterramento de Bolas de Gude (TEB). A duração total do *grooming* no TEB foi maior do que no Contexto do Medo Condicionado (CMC). Inversamente, a duração total do *grooming* na Extinção Operante (EXT) foi menor do que em todos os outros testes (Figura 7A).

A ANOVA para medidas repetidas apontou efeito significativo do tipo de teste sobre a duração do *grooming* rostral ($F_{[18,15]} = 4,156$; $p < 0,0001$) e sobre a duração do

grooming corporal ($F_{[22,42]} = 4,156$; $p < 0,0001$). A análise *post hoc* mostrou que tanto a duração do *grooming* rostral quanto a do corporal na EXT foram menores do que nos outros testes. As durações do *grooming* corporal no LCE e no TEB foram maiores do que nos outros testes, mas não diferiram entre si. Nenhuma diferença significativa foi detectada entre as durações do *grooming* rostral ou corporal dos outros testes. Adicionalmente, o teste *t* de para amostras pareadas mostrou que duração do *grooming* corporal foi maior do que a duração do *grooming* rostral no LCE ($t = 4,017$, $p < 0,001$) e no TEB ($t = 4,805$, $p < 0,0001$), enquanto na EXT, o teste de Wilcoxon apontou que esse resultado foi inverso ($W = 558,0$; $p < 0,001$) (Figura 7B).

A Tabela 2 mostra comparações entre os testes comportamentais do *grooming* rostral vs rostral ou *grooming* corporal vs corporal por bloco da sessão. O teste de Friedman (*Friedman*) revelou efeito significativo do tipo de teste sobre o *grooming* rostral no Bloco 1 ($Fr = 33,15$; $p < 0,0001$), no Bloco 2 ($Fr = 27,14$; $p < 0,0001$), no Bloco 3 ($Fr = 34,88$; $p < 0,0001$), no Bloco 4 ($Fr = 18,81$; $p = 0,0009$), no Bloco 5 ($Fr = 10,58$; $p = 0,0317$) e no Bloco 6 ($Fr = 11,94$; $p = 0,0178$). A análise *post hoc* mostrou que o *grooming* rostral na EXT foi menor do que em todos os outros testes nos Blocos 1, 2 e 3, e menor do que no LCE e no TEB no Bloco 4. O *grooming* rostral na P-IM foi menor do que no LCE somente no Bloco 6. Apesar de o teste de Friedman ter apontado um efeito significativo do tipo de teste sobre Bloco 5, a análise *post hoc* não detectou diferenças.

Tabela 2 – Comparações entre o *grooming* rostral ou corporal do mesmo bloco da sessão de testes diferentes.

Testes		LCE	TEB	EXT	CMC	P-IM
<i>Duração do grooming</i>						
Bloco 1	<i>Rostral</i>	28,51 ±2,57	30,23 ±2,52	15,42 ±2,10 °	33,56 ±3,90	37,12 ±3,04
	<i>Corporal</i>	5,31 ±1,02	8,56 ±2,12	3,92 ±0,89 #	7,267 ±2,46 #	21,01 ±3,59
Bloco 2	<i>Rostral</i>	27,96 ±3,12	27,4 ±3,29	7,11 ±1,52 °	28,08 ±4,29	28,42 ±3,75
	<i>Corporal</i>	25,94 ±5,46	23,79 ±3,77	4,95 ±1,02 +*#	20,11 ±4,00	32,26 ±5,71
Bloco 3	<i>Rostral</i>	23,68 ±3,04	20,95 ±3,50	5,55 ±2,76 °	21,98 ±3,63	20,12 ±3,81
	<i>Corporal</i>	47,51 ±7,22	38,19 ±6,40	5,67 ±1,37 +*#	24,66 ±5,82	26,71 ±5,37
Bloco 4	<i>Rostral</i>	24,48 ±2,56	21,34 ±3,58	9,13 ±2,68 +*	15,27 ±3,40	25,32 ±4,77
	<i>Corporal</i>	57,07 ±8,61	47,5 ±8,94	6,15 ±1,56 +*	21,76 ±6,49 +*	27,9 ±5,14
Bloco 5	<i>Rostral</i>	23,85 ±3,58	13,52 ±2,59	11,91 ±3,53	13,25 ±3,42	15,01 ±3,25
	<i>Corporal</i>	57,13 ±10,04	36,83 ±6,64	8,33 ±1,93 +*	21,84 ±6,96 +*	23,69 ±7,31 +
Bloco 6	<i>Rostral</i>	16,47 ±2,71	8,78 ±1,64	10,33 ±2,37	14,72 ±3,80	8,66 ±3,46 +
	<i>Corporal</i>	45,46 ±8,11	48,22 ±9,94	4,17 ±0,96 +*	13,96 ±4,41 +*	13,79 ±4,70 +*

Os dados estão representados pela média (±E.P.M). °, $p < 0,05$ comparado aos outros testes; +, $p < 0,05$ comparado ao LCE; *, $p < 0,05$ comparado ao TEB; #, $p < 0,05$ comparado a P-IM (teste *post hoc* de Dunn).

O teste de Friedman também revelou efeito significativo do tipo de teste sobre o *grooming* corporal no Bloco 1 (Fr = 19,05; P = 0.0008), no Bloco 2 (Fr = 22,56; p = 0.0002), no Bloco 3 (Fr = 36,51; p < 0.0001), no Bloco 4 (Fr = 32,77; p < 0.0001), no Bloco 5 (Fr = 27,07; p < 0.0001) e no Bloco 6 (Fr = 39,20; p < 0.0001). A análise *post hoc* mostrou que o *grooming* corporal na EXT foi menor que no na P-IM no Bloco 1, menor do que no LCE, no TEB e na P-IM nos Blocos 2 e 3, e menor do que no LCE e no TEB do que nos Blocos 4, 5 e 6. No CMC, *grooming* corporal foi menor do que na P-IM no Bloco 1 e menor do que no LCE e no TEB nos Blocos 4, 5 e 6. Na P-IM, o *grooming* corporal foi menor do que no LCE no Bloco 5, e menor do que no LCE e no TEB no Bloco 6. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os outros testes.

5 DISCUSSÃO

Este estudo objetivou investigar como contextos estressores diferentes alteram o *grooming* e quais padrões desse comportamento são formados por essas alterações. Para isso, o *grooming* foi subdividido e avaliado quanto a sua distribuição regional (i.e., *grooming* rostral e corporal) e temporal nas sessões. Foram utilizados cinco paradigmas-teste conhecidos por induzir comportamentos indicadores de estresse/ansiedade em roedores. Nossos resultados mostraram que a distribuição regional do *grooming* é alterada diferentemente entre os estressores. Quando a tradicional medida de duração total do *grooming* é observada, nota-se que os contextos considerados mais estressantes reduziram o tempo geral de *grooming* em relação a contextos menos estressantes. Ao analisar a distribuição regional do *grooming*, o presente estudo permitiu observar que essa diferença gerada pelos testes se deve muito mais a variação do *grooming* corporal que a do rostral.

Picos de atividade exploratória foram observados ao início da sessão no labirinto em cruz elevado (LCE), no teste do enterramento de bolas-de-gude (TEB) e na observação pós-imobilização (P-IM). Esse é um resultado esperado, uma vez que esses testes constituem-se ambientes novos para o rato. Entretanto, um pico de exploração-locomotoção também foi encontrado no início da sessão no contexto do medo condicionado (CMC), ainda que aparentemente não houvesse qualquer novidade. Mesmo o *grooming* também apresentou um padrão característico de início de sessão independente do tipo de teste. No Bloco 1 de todos os testes, o *grooming* corporal esteve sempre rebaixado em relação ao *grooming* rostral. Esse dado também pode ser observado em outros estudos que avaliaram o efeito de estressores sobre a distribuição regional do *grooming* num período de cinco minutos (Enginar, Hatipoğlu, & Firtina, 2008; Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005b)

Em consequência, tais resultados parecem apontar que o início de sessão exerce um efeito característico devido provavelmente à mudança de contexto, e não exatamente devido à novidade [cf. (Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979b; van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994)]. Portanto, se há um padrão de ação do rato no início da sessão, indiferenciado em praticamente todos os testes, os minutos iniciais não parecem suficientemente informativos acerca do efeito de estressores sobre o *grooming* (Estanislau, 2012). Ao que parece, se alguém quer entender como o *grooming* é afetado diferencialmente, esta informação estará contida após os períodos iniciais de testagem.

5.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Neste trabalho, apenas metade dos ratos saíram para os braços abertos. Isso ocorreu provavelmente como um efeito do procedimento anterior (Hogg, 1996) de modelagem de resposta de pressão à barra. Devido a pouca exploração de braços abertos encontrada, as medidas comportamentais utilizadas para inferir a habituação à novidade no LCE foram a avaliação de risco (i.e., *stretched-attend postures* – SAP) e a locomoção (i.e., entradas nos braços fechados). O SAP e a locomoção tiveram seus picos no início da sessão e declinaram no primeiro terço da sessão, estabilizando-se a partir do segundo terço da sessão. Esse declínio gradual parece indicar habituação ao contexto do LCE. Além disso, a queda desses comportamentos foi acompanhada pelo aumento gradual da duração do *grooming*. A análise da distribuição regional do *grooming* mostrou que esse aumento gradual pode ser atribuído ao aumento da duração do *grooming* corporal ao longo da sessão. De forma surpreendente, a duração do *grooming* rostral permaneceu estatisticamente inalterada desde o início da testagem.

Esses resultados concordam com pesquisas anteriores que consideram o aumento gradual de *grooming* como um sinal de habituação ou *coping* ao estresse provocado por um ambiente novo (Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979b; Komorowska & Pisula, 2003; van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994). A predominância de *grooming* rostral (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005b; Komorowska & Pisula, 2003; Komorowska & Pellis, 2004) junto ao pico de atividade no início da testagem (Roth & Katz, 1979) tem sido sugerida como um sinal de excitabilidade (*arousal*) elevada no início da sessão. Seria esperado, portanto, que a habituação ao ambiente novo também se expressasse por meio do declínio do *grooming* rostral ao decorrer da sessão (Komorowska & Pisula, 2003). Mas nosso resultado mostrou que o componente rostral do *grooming* não variou durante a sessão no LCE. Essa diferença de resultado entre o presente trabalho e outros estudos se deve provavelmente a procedimentos de categorização e análise do *grooming* distintos (Komorowska & Pisula, 2003; Komorowska & Pellis, 2004). De todo modo, se o aumento gradual de *grooming* pode indicar habituação, isso pode ser atribuído, no contexto do LCE, ao prolongamento da duração do *grooming* corporal.

5.2 TESTE DO ENTERRAMENTO DE BOLAS DE GUDE (TEB)

Um pico de exploração espacial (i.e., cruzamentos) seguido de uma tendência ao declínio pode ser observado no TEB. Assim como no LCE, esse declínio de comportamento exploratório parece indicar habituação ao decorrer da sessão. Além disso, o tempo de escavação também seguiu uma tendência à queda. Se há uma tendência à queda no comportamento de escavação juntamente com a queda de exploração ao longo do tempo, é plausível assumir que, ao longo do tempo, também há redução de excitabilidade ao contexto do TEB.

Um padrão similar ao *grooming* no LCE pode ser observado no TEB. Estatisticamente, a duração total do *grooming* permaneceu estável ao longo da sessão. No entanto, o curso temporal da distribuição regional do *grooming* mostrou que, assim como no LCE, o *grooming* corporal sobrepôs o *grooming* rostral a partir do segundo terço da sessão. O *grooming* rostral também permaneceu estável e declinou somente a partir do último terço da sessão. De forma interessante, tanto o LCE quanto o TEB são contextos novos e, nesse sentido, o *grooming* nesses dois testes pode ser considerado como induzido por novidade. Dessa forma, se o aumento gradual do *grooming* pode indicar habituação ao contexto, então a habituação no TEB parece também ser indicada pelo aumento do *grooming* corporal. Nesse sentido, o curso temporal do *grooming* no TEB parece replicar, em grande parte, o curso temporal do *grooming* no LCE.

5.3 EXTIÇÃO OPERANTE (EXT)

As pressões à barra na EXT seguiram a conhecida tendência ao declínio em virtude da suspensão de reforçamento e estabilizaram a partir do segundo terço da sessão. Gray & McNaughton, (2000) propuseram a teoria de que o não-reforçamento de um comportamento aprendido (i.e., frustração) pode participar na ativação de um sistema de inibição comportamental paralelo à mediação da ansiedade [ver (McNaughton & Corr, 2004)]. Nesse sentido, a queda na frequência de respostas de pressão à barra encontrada no presente estudo poderia ser explicada por esse mecanismo. Em acréscimo, a fortalecer essa noção de que a extinção pode envolver ansiedade, existe a observação de que a extinção de um comportamento previamente fortalecido em um esquema de reforçamento contínuo pode ser atrasada por um agonista benzodiazepínico (Buckland, Mellanby, & Gray, 1986).

De forma interessante, o *grooming* na EXT foi drasticamente suprimido em relação aos outros contextos. Esse resultado não pode ser explicado pela concorrência com a resposta de pressão à barra porque a razão média de respostas por bloco é muito pequena para cobrir cinco minutos de cada bloco da sessão. Ocorre que na EXT houve a presença de duas variáveis estressoras: a ausência de reforço de uma resposta previamente fortalecida e a privação de água. Ambas essas variáveis têm sido relatadas ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal [e.g., extinção: (Boer, Beun, Slangen, & Gugten, 1990; Coover, Goldman, & Levine, 1971); privação de água: (Kiss, Jezova, & Aguilera, 1994)], podendo, portanto, serem vistas como estressoras. Sendo estressoras, se poderia esperar que essas variáveis elevassem o *grooming* (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992). Mas porque o *grooming* foi suprimido no nosso procedimento? Um primeiro ponto a se considerar é que ratos privados de água foram relatados fazer menos *grooming* em comparação a ratos não privados, possivelmente como uma forma de economizar a água que seria perdida com a saliva (Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979a). No entanto, no experimento de Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, (1979a), os ratos privados e posteriormente reforçados ao pressionar a barra por água fizeram tanto *grooming* na Caixa de Skinner quanto os ratos não privados de água observados em um ambiente padrão. Isso porque o *grooming* na Caixa de Skinner tendeu a aumentar gradativamente ao decorrer do tempo, paralelamente ao aumento dos escores de consumo de água. Diferentemente do nosso experimento, o procedimento de Jolles e cols. não envolveu frustração (i.e., não-reforçamento). Uma explicação alternativa em relação ao que houve com o *grooming* na EXT é que o não-reforçamento, ao ativar o sistema de inibição comportamental (Gray & McNaughton, 2000b), pode ter suprimido o *grooming* assim como a resposta de pressão à barra. Vale ainda notar que tanto o estímulo/contexto gerador da frustração quanto à privação de água estiveram presentes por toda a sessão. Nesse sentido, se o *grooming* pode marcar a redução de excitação ou a habituação a estímulos ansiogênicos, a permanência desses estímulos também pode ter inibido o *grooming*.

5.4 CONTEXTO DO MEDO CONDICIONADO (CMC)

O *congelamento* manteve-se estavelmente elevado durante quase toda a sessão do CMC. Contudo, não foi observada uma supressão de outros comportamentos equivalente a da primeira sessão (exposição ao choque elétrico) do procedimento (dados não mostrados). No início da sessão do CMC houve um sutil pico de exploração (i.e., cruzamentos

e *levantar-se*) em relação ao restante da sessão, o que pode se relacionar com a *aproximação defensiva* ao CMC (McNaughton & Corr, 2004).

A estabilidade, ao longo da sessão, da duração total do *grooming* parece acompanhar a estabilidade da duração do *congelamento*. Esses resultados junto à queda na exploração sugerem uma alternância entre uma resposta de atenção/excitabilidade ao contexto (i.e., o *congelamento*) (McNaughton & Corr, 2004) e um comportamento relacionado com a redução de excitabilidade (i.e., o *grooming*) (Spruijt, van Hooff, & Gispen, 1992). Vale notar que essa alternância perdurou por toda a sessão. Em acréscimo, o *grooming* corporal esteve rebaixado em comparação ao rostral durante o primeiro terço da sessão. Apesar de o *grooming* corporal ter tendido a aumentar, ele não chegou a sobrepor o *grooming* rostral com o passar do tempo, mesmo que o *grooming* rostral tenha tendido ao declínio. O que as curvas temporais da distribuição regional mostram é que houve uma estabilização do *grooming* corporal junto ao rostral. Se estiver correta a ideia de que o aumento gradual e prolongamento da duração do *grooming* corporal pode indicar habituação/redução de excitação, então o atraso no prolongamento do *grooming* corporal observado no CMC pode indicar aversividade estendida durante a sessão. Tomados em conjunto, esses resultados levam a inferir que a organização do *grooming* observada no CMC representa uma forma de expressão de *grooming* característica de ansiedade prolongada. Nesse sentido, o contexto extensamente ansiogênico (identificável pelos altos níveis de *congelamento* ao longo da sessão) teve um efeito de retardar a habituação expressada pelo aumento da duração do *grooming* corporal.

5.5 OBSERVAÇÃO PÓS-IMOBILIZAÇÃO (P-IM)

Há de se considerar no P-IM duas variáveis estressoras: a imobilização anterior e a caixa de observação. Por mais empobrecida de estimulação que a caixa de observação seja (como descrito na metodologia), ela se constitui um ambiente completamente novo para o rato. O padrão observado nas curvas das medidas relativas à exploração (i.e., cruzamentos e *levantar-se*) constitui um efeito conhecido da resposta à novidade (Beerling, et al., 2011; Bindra & Spinner, 1958) e à combinação de outro estressor seguido de novidade (Katz, Roth, & Carroll, 1981). A literatura relacionada à imobilização mostra queda da atividade locomotora e da exploração de ratos previamente imobilizados em relação a não imobilizados [ver (Buynitsky & Mostofsky, 2009)]. Contudo, como nosso delineamento não possui um grupo de controle, torna-se impossível dizer que houve queda ou ascensão de

exploração. O fato é que houve uma curva descendente de exploração e, dessa forma, o pico de exploração típico de início de sessão seguido de uma queda gradual observado (Roth & Katz, 1979) é mais provável ser devido a um efeito do contexto novo do que do procedimento anterior de imobilização.

Em contraste, as curvas de *grooming* não se assemelham com as curvas observadas em contextos de novidade (Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979b; Komorowska & Pisula, 2003; van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994) como no LCE e no TEB. Mas diferentemente dos outros procedimentos deste trabalho, na P-IM, a exposição ao estressor foi precedente à observação. O pico de *grooming* foi observado no início da sessão seguindo uma tendência ao declínio, e não à ascensão. Em conformidade com isso, Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, (1979b) observaram um resultado similar quando manipularam ratos anteriormente à exposição a um ambiente novo. Esses autores argumentaram que o “estímulo apresentado antes da observação pode aumentar o *grooming* imediatamente após sua remoção, enquanto que o estímulo apresentado durante a observação pode prolongar o *grooming* ao decorrer do período de observação” (pp. 570). Isso pode explicar o porque de tanto o *grooming* corporal quanto o rostral ter tendido ao declínio com passar do tempo.

Em específico, seria esperado [e.g. (Komorowska & Pisula, 2003)] que o *grooming* corporal ascendesse como uma forma de habituação ou *coping* à novidade. Mas há de se considerar que o procedimento prévio de imobilização possa ter tornado o contexto novo mais estressante (ou tornado os ratos mais ansiosos em resposta a novidade) e, em consequência, ter prevenido o prolongamento de *grooming* ao decorrer do período de observação [cf. (Isaacson, Hannigan Jr., Brakkee, & Gispen, 1983)]. O fato de ter havido um pico de *congelamento* no segundo e terceiro sexto da sessão reforça essa ideia. Isso parece sensato uma vez que a imobilização aguda pode aumentar a sensibilidade da resposta do eixo HPA a ambientes novos, mas não a contextos conhecidos [e. g., (Belda, Fuentes, Nadal, & Armario, 2008)]. Nesse sentido, o *coping* ao estresse por novidade, inferido pelo aumento gradual de *grooming* corporal no presente estudo, parece ter sido prejudicado pelo procedimento anterior de imobilização.

5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o presente momento, tem-se defendido que o *grooming* corporal parece ser uma medida mais sensível da resposta de *coping* a estressores ambientais. Essa ideia parece ser ainda mais defensável quando as durações do *grooming* (i.e., do *grooming* corporal, rostral e total) são comparadas entre os testes. Os contextos que mostraram mais efeitos ansiogênicos sobre os comportamentos dos ratos tenderam a reduzir o *grooming* em comparação aos contextos menos ansiogênicos. Por exemplo, a duração total *grooming* no CMC e na P-IM foram menores do que no LCE. O *grooming* na EXT foi drasticamente suprimido. Em contraste, o LCE e o TEB são claramente os contextos que mais permitem ao animal se engajar em alguma estratégia de *coping* comportamental e, de forma interessante, foram contextos que facilitaram a ocorrência do *grooming*. O LCE e o TEB tiveram as maiores durações de *grooming* e foram similares entre si. Como já mencionado, ambos esses testes são paradigmas que envolvem a novidade como principal estressor e a distribuição regional do *grooming* foi semelhantemente sensível a isso. Embora a duração total do *grooming* não tenha sido diferente entre o TEB a P-IM, a análise da distribuição regional do *grooming* mostrou diferenças claras entre o tipo de *grooming* ocorrido em cada um desses testes. Nesse sentido, enquanto a distribuição regional do *grooming* no TEB foi semelhante no LCE, a distribuição regional do *grooming* na P-IM foi similar a encontrada no CMC.

Em específico, os braços fechados do labirinto em cruz constituem-se como um local seguro para o rato e isso parece ter facilitado o *grooming* que é visto aumentado em relação à maioria dos outros testes. Em acréscimo, o *grooming* de ratos foi relatado aumentar em resposta a um tratamento ansiolítico pelo agonista GABA_A muscimol, enquanto reduziu em resposta a um tratamento ansiogênico pelo antagonista GABA_A bicuculina (Osborne, Mataga, Onoe, & Watanabe, 1993). No Campo Aberto, o tratamento crônico com o inibidor seletivo de recaptção de serotonina fluoxetina (conhecida por seus efeitos ansiolíticos) também foi relatado aumentar a duração de *grooming* em ratos (Schulz, Buddenberg, & Huston, 2007) e, em camundongos, esse mesmo efeito foi observado em resposta ao agonista benzodiazepínico diazepam (Choleris, Thomas, Kavaliers, & Prato, 2001). Em destaque, um aumento de *grooming* em resposta ao agonista benzodiazepínico clordiazepóxido também foi observado em camundongos no labirinto em cruz elevado (Rodgers, Davies, & Shore, 2002). Um detalhe importante é que em nenhum desses estudos foi feita uma análise detalhada do

grooming. Fica, portanto, a dúvida sobre qual tipo de *grooming* (i.e., rostral ou corporal) foi facilitado pelo tratamento ansiolítico nesses trabalhos.

Em particular, o alto nível de *grooming* no LCE e no TEB observado em nosso estudo foi claramente devido ao aumento da duração do *grooming* corporal. De forma interessante, a oxitocina (Drago, Pedersen, Caldwell, & Prange Jr., 1986) e a prolactina (Drago & Bohus, 1981) foram relatadas aumentar o *grooming* genital em ratos (que é considerado no presente estudo como um sub-elemento do *grooming* corporal) e várias evidências apontam que esses neuropeptídeos possuem efeitos ansiolíticos ou atenuadores sobre respostas comportamentais e neurais ao estresse (Neumann, Krömer, Toschi, & Ebner, 2000; Neumann, Torner, & Wigger, 2000; Uvnäs-Moberg, Ahlenius, Hillegaard, & Alster, 1994; Windle, Shanks, Lightman, & Ingram, 1997; Yyou, Ito, Yamamoto, Kitagawa, & Okamura, 2010) Ademais, a oxitocina foi relatada diminuir a expressão da proteína *c-fos* em regiões cerebrais ligadas a modulação do eixo HPA (Windle, et al., 2004). Essas evidências parecem indicar que o *grooming* direcionado ao corpo ocorre quando o animal está sob um menor controle de estímulos ansiogênicos. Em acordo com essa ideia, um estudo mostrou que a duração do *grooming* genital foi maior em um grupo de ratos expostos a um ambiente escuro (menos estressante) do que os expostos a um ambiente intensamente iluminado (mais estressante) (Kalueff & Tuohimaa, 2005b).

No presente estudo, a comparação da distribuição regional do *grooming* entre os testes mostrou que o total de *grooming* rostral foi pouco sensível aos diferentes contextos aos quais os ratos foram submetidos (cf. Figura 7B). Alguns estudos têm apontado que a variação quantitativa de *grooming* rostral pode servir como índice de estresse ou ansiedade (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005b; Komorowska & Pisula, 2003). No entanto, na comparação entre os testes, nossos dados mostraram que o *grooming* rostral foi praticamente invariável (cf. Tabela 2) tanto nos primeiros cinco minutos de sessão quanto nos demais. A EXT parece ser um caso a parte. Por um lado, pode-se observar que houve mais *grooming* rostral do que corporal no contexto da EXT. Por outro lado, se considerado que (1) os estímulos estressores estiveram sempre presentes no contexto da extinção (i.e., não-reforçamento e privação de água) e (2) nos outros testes o *grooming* corporal pareceu representar melhor o *coping* ao estressor, seria sensato pensar que a EXT impediu qualquer forma de *coping* comportamental. Em todo caso, se a EXT impediu o *grooming* sob forma *coping*, então o extremo rebaixamento de *grooming* corporal parece representar melhor isso, mais do que o predomínio do *grooming* rostral.

Em conclusão, o presente estudo reforça a concepção anterior de que sessões curtas são pouco informativas (e que sessões mais longas são necessárias) para se obter medidas do *grooming* mais significativas para a avaliação de estresse e ansiedade (Estanislau, 2012). Além disso, como o *grooming* se mostra como um comportamento de *coping* às contingências estressoras, um maior foco deveria ser dado a quais aspectos no *grooming* representam melhor isso. No caso de nossos resultados, se a progressão de *grooming* corporal pode marcar a habituação ou redução de excitação (*dearousal*), seria presumível que seu atraso ou supressão marcasse excitação (*arousal*). Isso se mostra útil, portanto, como uma potente medida na investigação de amplos espectros de transtornos relacionados ao estresse e ansiedade. Pesquisas futuras direcionadas à validação preditiva desse modelo de análise são requeridas.

REFERÊNCIAS

- Beerling, W., Koolhaas, J., Ahnaou, A., Bouwknecht, J., Boer, S., Meerlo, P., & Drinkenburg, W. (2011). Physiological and hormonal responses to novelty exposure in rats are mainly related to ongoing behavioral activity. *Physiology & Behavior*, *103*, 412-420.
- Belda, X., Fuentes, S., Nadal, R., & Armario, A. (2008). A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Hormones and Behavior*, *54*, 654-661.
- Berridge, K. C. (1990). Comparative Fine Structure of Action: Rules of Form and Sequence in the Grooming Patterns of Six Rodent Species. *Behavior*, *113*(1-2), 21-56.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology*, *3*(4).
- Berridge, K., Fentress, J., & Parr, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioural Brain Research*, *23*, 59-68.
- Bindra, D., & Spinner, N. (1958). Response to different degrees of novelty: the incidence of various activities. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, *1*(4), 341-350.
- Boer, S., Beun, R., Slangen, J., & Gugten, v. (1990). Dynamics of plasma catecholamine and corticosterone concentrations during reinforced and extinguished operant behavior in rats. *Physiology & Behavior*, *47*, 691-698.
- Bressers, W. M., Kruk, M. R., Erp, A. M., Willekens-Bramer, D. C., Haccou, P., & Meelis, E. (1995a). Time Structure of Self-Grooming in the Rat: Self-Facilitation and Effects of Hypothalamic Stimulation and Neuropeptides. *Behavioral Neuroscience*, *109*(5), 955-964.
- Bressers, W. M., Kruk, M. R., Van Erp, A. M., Willekens-Bramer, D. C., Haccou, P., & Meelis, E. (1995b). A time-structured analysis of hypothalamically induced increases in self-grooming and activity in the rat. *Behavioral Neuroscience*, *109*(6), 1158-1171.
- Broekkamp, C., Rijk, H., Joly-Gelouin, D., & Lloyd, K. (1986). Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *European Journal of Pharmacology*, *126*(3), 223-229.
- Buckland, C., Mellanby, J., & Gray, J. (1986). The effects of compounds related to gamma-aminobutyrate and benzodiazepine receptors on behavioural responses to anxiogenic stimuli in the rat: extinction and successive discrimination. *Psychopharmacology*, *88*(3), 285-295.

- Buynitsky, T., & Mostofsky, D. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 1089-1098.
- Choleris, E., Thomas, A., Kavaliers, M., & Prato, F. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.
- Coover, G., Goldman, L., & Levine, S. (1971). Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. *Physiology and Behavior*, 6, 261-263.
- Drago, F., & Bohus, B. (1981). Hyperprolactinemia-Induced Excessive Grooming in the Rat: Time-Course and Element Analysis. *Behavioral and Neural Biology*, 33, 117-122.
- Drago, F., Pedersen, C., Caldwell, J., & Prange Jr., A. (1986). Oxytocin Potently Enhances Novelty-Induced Grooming Behavior in the Rat. *Brain Research*, 368, 287-295.
- Eckstein, R. A., & Hart, B. L. (2000). The organization and control of grooming in cats. *Applied Animal Behaviour Science*, 68, 131-140.
- Enginar, N., Hatipoğlu, İ., & Firtına, M. (2008). Evaluation of the acute effects of amitriptyline and fluoxetine on anxiety using grooming analysis algorithm in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 89, 450-455.
- Estanislau, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5(1), 169-177.
- Fairbanks, L. A. (1977). Animal and Human Behavior: Guidelines for Generalization across Species. In M. T. McGuire, & L. A. Fairbanks, *Ethological Psychiatry: Psychopathology in the Context of Evolutionary Biology* (pp. 87-110). New York: Grune & Stratton, Inc.
- Fentress, J. C. (1973). Development of Grooming in Mice with Amputated Forelimbs. *Science*, 179, 704-705.
- Fentress, J. C. (1988). Expressive Contexts, Fine Structure, and Central Mediation of Rodent Grooming. *Annals New York Acad. Sc.*, 525, 18-26.
- Geyer, M. A., & Markou, A. (1995). Animal Models of Psychiatric Disorders. In F. Bloom, & D. Kupfer, *Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress* (pp. 787-798). New York: Raven Press.
- Gispen, W., & Isaacson, R. (1981). ACTH-induced excessive grooming in the rat. *Pharmacology & Therapeutics*, 12(1), 209-246.
- Graeff, F. G. (2005a). Bases Psicológicas. In: F. G. Graeff, & F. S. Guimarães, *Fundamentos de Psicofarmacologia* (pp. 43-52). São Paulo - SP: Atheneu.

- Graeff, F. G. (2005b). Medicamentos Ansiolíticos. In: F. G. Graeff, & F. S. Guimarães, *Fundamentos de Psicofarmacologia* (pp. 123-160). São Paulo, SP: Atheneu.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000a). Obsessive-Compulsive Disorder. In J. A. Gray, & N. McNaughton, *The Neuropsychology of Anxiety - An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System* (2^a ed., pp. 324-326). New York: Oxford University Press Inc.
- Gray, J., & McNaughton, N. (2000b). A theory of the behavioural inhibition system. In: J. A. Gray, & N. McNaughton, *The Neuropsychology of Anxiety - An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System* (2^a ed., Vol. 33, pp. 84-93). New York: Oxford University Press Inc.
- Greidanus, T. v., Donker, D., Bergmann, F. v., Bekenkamp, R., Mairret, C., & Spruijt, B. (1985). Comparison between excessive grooming induced by bombesin or by ACTH. *Peptides*, 6, 369-372.
- Gyertyán, I. (1995). Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. *Behavioural Pharmacology*, 6, 24-31.
- Hinde, R. A. (1977). The Relevance of Animal Studies to Human Neurotic Disorders. In M. T. McGuire, & L. A. Fairbanks, *Ethological Psychiatry: Psychopathology in the Context of Evolucionary Biology*. New York: Grune & Stratton, Inc.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 21-30.
- Hugo, F., van Heerden, B., Zungu-Dirwayi, N., & Stein, D. J. (1999). Functional brain imaging in obsessive-compulsive disorder secondary to neurological lesions. *Depression and Anxiety*, 10(3), 129-136.
- Isaacson, R., Hannigan Jr., J., Brakkee, J., & Gispen, W. (1983). The Time Course of Excessive Grooming After Neuropeptide Administration. *Brain Research Bulletin*, 11, 289-293.
- Jaffard, R., Bontempi, B., & Menzaghi, F. (2001). Theoretical and Practical Considerations for the Evaluation of Learning and Memory in Mice. In: J. Buccafusco, *Methods of behavior analysis in neuroscience* (pp. 325-328). New York, Washington, D.C.: CRC Press LLC.
- Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., & Gispen, W. (1979a). ACTH-Induced Excessive Grooming in the Rat: The Influence of Environmental and Motivation Factors. *Hormones and Behavior*, 12, 60-72.
- Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., & Gispen, W. (1979b). 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., & 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.
- Kalueff, A., & Tuohimaa, P. (2005c). Contrasting grooming phenotypes in three mouse strains markedly different in anxiety and activity (129S1, BALB/c and NMRI). *Behavioural Brain Research*, *160*, 1-10.
- Katz, R., Roth, K., & Carroll, B. (1981). Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *5*, 247-251.
- Kiss, A., Jezova, D., & Aguilera, G. (1994). Activity of the hypothalamic pituitary adrenal axis and sympathoadrenal system during food and water deprivation in the rat. *Brain Research*, *663*, 84-92.
- Komorowska, J., & Pellis, S. (2004). Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural Processes*, *67*, 287-293.
- 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.
- Man, J., Hudson, A. L., Ashton, D., & Nutt, D. J. (2004). Animal Models for Obsessive-Compulsive Disorder. *Current Neuropharmacology*, *2*, 169-181.
- McNaughton, N., & Corr, P. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *28*, 285-305.
- Morrisson, H. L., & McKinney, W. T. (1977). Models of Psychological Dysfunction: Ethological and Psychiatric Contributions. In M. T. McGuire, & L. A. Fairbanks, *Ethological Psychiatry: Psychopathology in the Context of Evolutionary Biology* (pp. 61-85). New York: Grune & Stratton, Inc.
- Neumann, I., Krömer, S., Toschi, N., & Ebner, K. (2000). Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regulatory Peptides*, *96*(1-2), 31-38.

- Neumann, I., Torner, L., & Wigger, A. (2000). Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience*, *95*(2), 561-575.
- Njung'e, K., & Handley, S. (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *38*(1), 63-67.
- Osborne, P., Mataga, N., Onoe, H., & Watanabe, Y. (1993). Behavioral activation by stimulation of a GABAergic mechanism in the preoptic area of rat. *Neuroscience Letters*, *158*(2), 201-204.
- Rodgers, R., Davies, B., & Shore, R. (2002). Absence of anxiolytic response to chlordiazepoxide in two common background strains exposed to the elevated plus-maze: importance and implications of behavioural baseline. *Genes, Brain and Behavior*, *1*(4), 242-251.
- Roth, K., & Katz, R. (1979). Stress, behavioral arousal, and open field activity - A reexamination of emotionality in the rat. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, *3*, 247-263.
- Schulz, D., Buddenberg, T., & Huston, J. (2007). Extinction-induced "despair" in the water maze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 624-634.
- Spruijt, B., van Hooff, J., & Gispen, W. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, *72*(3), 825-852.
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L., & Paylor, R. (2009). Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*, *204*(2), 361-373.
- Uvnäs-Moberg, K., Ahlenius, S., Hillegaard, V., & Alster, P. (1994). High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *49*(1), 101-106.
- Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, *146*, 3-17.
- 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.
- Windle, R. J., Kershaw, Y. M., Shanks, N., Wood, S. A., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (2004). Oxytocin Attenuates Stress-Induced c-fos mRNA Expression in Specific

Forebrain Regions Associated with Modulation of Hypothalamo–Pituitary–Adrenal Activity. *The Journal of Neuroscience*, 24(12), 2974-2982.

Windle, R., Shanks, N., Lightman, S., & Ingram, C. (1997). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats.

Endocrinology, 138(7), 2829-2834.

Yamada, K., Santo-Yamada, Y., & Wada, K. (2003). Stress-induced impairment of inhibitory avoidance learning in female neuromedin B receptor-deficient mice. *Physiology & Behavior*, 78(2), 303-309.

Yayou, K.-i., Ito, S., Yamamoto, N., Kitagawa, S., & Okamura, H. (2010). Relationships of stress responses with plasma oxytocin and prolactin in heifer calves. *Physiology & Behavior*, 99, 362-369.