



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO ALEXANDRE MÜNCHEN

**UTILIDADE DA AUTO-LIMPEZA PARA AVALIAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS REPETIDAMENTE EXPOSTOS A
SESSÕES PROLONGADAS DE LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

PAULO ALEXANDRE MÜNCHEN

**UTILIDADE DA AUTO-LIMPEZA PARA AVALIAÇÃO DA
ANSIEDADE EM RATOS REPETIDAMENTE EXPOSTOS A
SESSÕES PROLONGADAS DE LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO**

Dissertação em formato de artigo apresentada para Universidade Estadual de Londrina-UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no programa de pós-graduação em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Célio Estanislau.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M963a München, Paulo Alexandre.
Utilidade da auto-limpeza para avaliação da ansiedade em ratos
repetidamente expostos a sessões prolongadas de labirinto em cruz
elevado / Paulo Alexandre München. – Londrina, 2013.
33 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, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Comportamento – Análise – Teses. 2. Ansiedade – Modelos
animais – Teses. 3. Labirinto em cruz elevado – Teses. 4. 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

PAULO ALEXANDRE MÜNCHEN

**UTILIDADE DA AUTO-LIMPEZA PARA AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE
EM RATOS REPETIDAMENTE EXPOSTOS A SESSÕES
PROLONGADAS DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação em formato de artigo apresentada para Universidade Estadual de Londrina-UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no programa de pós-graduação em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Célio Estanislau
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP – São Paulo - SP

Dr. Eduardo Carvalho-Netto
Novartis Brasil

Londrina, 05 de abril de 2013.

AGRADECIMENTO

Os comentários e agradecimentos aqui tecidos se dirigem primeiramente ao meu grande mestre que foi meu Pai Mário Amadeu München (in memoriam) e que nos deixou durante o período em que eu estava realizando este curso, e a minha Mãe Judite Maria München pelo exemplo de vida e por terem sido os responsáveis por esta conquista.

Agradecimentos dignos de grandes mestres a todo o corpo docente do curso de Mestrado em Análise do Comportamento pela competência desmedida na condução dos trabalhos e na aquisição do conhecimento, especialmente ao meu Orientador o Professor Doutor Célio Estanislau.

MÜNCHEN, Paulo Alexandre. **Utilidade da auto-limpeza para avaliação da ansiedade em ratos repetidamente expostos a sessões prolongadas de labirinto em cruz elevado**. 2013. 33 f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo animal usado para estudar o efeito de diferentes drogas sobre a ansiedade em roedores. As principais medidas utilizadas para se avaliar a ansiedade no LCE são o tempo gasto e a porcentagem de entradas nos braços abertos. A literatura demonstra que uma sessão prévia de cinco minutos torna tais medidas insensíveis aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos nos testes subseqüentes (fenômeno conhecido como *one trial tolerance*, OTT). Existem trabalhos que têm sugerido que alguns parâmetros do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) podem constituir medidas úteis de ansiedade. É possível que esses parâmetros não apresentem OTT. Esta pesquisa objetivou descrever os efeitos produzidos por uma droga ansiolítica e uma ansiogênica em exposições repetidas e prolongadas de ratos ao LCE. Por apresentar sensibilidade bidirecional ao diazepam e a cafeína, os dados apontam para a conclusão de que o *grooming*, principalmente a frequência de episódios na terceira sessão e o componente rostral na segunda sessão de exposição, se apresentaram enquanto medidas úteis, podendo ser utilizados como marcador confiável na avaliação de ansiedade em ratos. A repetição da exposição sinalizou a detecção de vários efeitos sobre o *grooming* que não foram detectados na primeira passagem proporcionando um melhor e mais claro entendimento dos efeitos da interação que este comportamento estabelece com os eventos a serem estudados.

Palavras-chave: Ansiedade. Labirinto em cruz elevado. *Grooming*. Modelo animal.

MÜNCHEN, Paulo Alexandre. **Utilidade da auto-limpeza para avaliação da ansiedade em ratos repetidamente expostos a sessões prolongadas de labirinto em cruz elevado.** 2013. 33 f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The elevated plus-maze (EPM) is an animal model used for studying the effects of different drugs on anxiety in rodents. The main measurements used to assess anxiety in the EPM are the time spent in and the percentage of entries into the open arms. Literature has shown that a previous session of five minutes makes such measures insensitive to the anxiolytic effects of benzodiazepines in subsequent tests (a phenomenon known as one trial tolerance, OTT). However, there are studies that have suggested that some parameters of grooming behavior can provide useful measurements of anxiety. It is possible that these are not affected by OTT. This study was aimed at describing the effects produced by an anxiolytic (diazepam) and an anxiogenic (caffeine) drug on behavior during repeated and prolonged exposure of rats to the EPM. By displaying bidirectional sensitivity to diazepam and caffeine the data draw to the conclusion that grooming, especially its bout frequency in the third session and second session's rostral component duration, can provide useful measures that can be used as reliable markers in evaluating anxiety. Even during repeated sessions, drug effects could be detected on some grooming measures. The fact that these effects, though present in other sessions, were not detected in the first passage suggests that the repeated sessions protocol provides a better and clearer understanding of the effects of the interaction that this behavior sets with the events being studied.

Keywords: Anxiety. Elevated plus-maze. Grooming. Animal model.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de sujeitos e drogas.....	14
Tabela 2 – Efeito das Drogas sobre as medidas LCE (exposição 30 min).....	23
Figura 1 – Efeito das Drogas sobre as medidas LCE (exposição 05 min).....	17
Figura 2 – Efeito das drogas sobre o comportamento de <i>Grooming</i>	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 MÉTODO	12
2.1 SUJEITOS.....	12
2.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	12
2.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	12
2.2.2 Drogas	13
2.3 PROCEDIMENTO	13
2.3.1 Experimento 1.....	13
2.3.2 Experimento 2.....	14
2.4 CATEGORIAS COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i>	14
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
3 RESULTADOS	16
3.1 EXPERIMENTO 1	16
3.2 EXPERIMENTO 2: MEDIDAS DE <i>GROOMING</i>	18
3.3 MEDIDAS CONVENCIONAIS	22
4 DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade é reconhecidamente uma das maiores queixas enfrentadas nos tempos atuais, tal comportamento é caracterizado como um estado quase constante e permanente de inquietação, preocupação, angústia e medo, que provoca mal estar e tensão (Santiago, 2006).

No estudo da psicobiologia da ansiedade, algo que tem auxiliado na compreensão da fisiopatologia e tratamento são os modelos animais. No caso da ansiedade, são medidos comportamentos de defesa a ameaças características da espécie. Para ser considerado válido, um modelo animal de ansiedade deve ter validade preditiva (previsibilidade), de face (semelhança) e de construto teórico (homologia) (Cruz et al., 1997; Lister, 1990; Willner, 1986; Rodgers & Cole, 1994; Graeff, 2005). Um dos mais empregados modelos de ansiedade tem sido o chamado Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O LCE possui formato de cruz e é composto por dois braços fechados com paredes e dois braços abertos e os sujeitos são colocados na interseção dos quatro braços com a cabeça apontada para entrada de um braço fechado e seus comportamentos são tipicamente registrados por um período de 5 min (Lister, 1990; Gonzalez & File, 1997). O animal explora os dois tipos de braços, mas entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Dois índices de ansiedade podem ser destacados: o número de entradas nos braços abertos, expresso como a porcentagem do total do número de entradas nos braços, e a quantidade de tempo gasto nos braços abertos, expressa como a porcentagem do total de tempo em ambos os braços abertos e fechados (Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986).

O labirinto em cruz tem sido utilizado como um modelo animal de ansiedade por quase três décadas e é um dos modelos mais utilizado em todo mundo. Foi criado por Handley e Mithani (1984) e validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente como modelo animal de ansiedade por Pellow, Chopin, File e Briley (1985).

O teste é rápido e mostrou-se sensível aos efeitos de ambos agentes ansiolíticos e ansiogênicos (drogas que aumentam a ansiedade, particularmente as que exercem ação inversa à dos ansiolíticos). Agentes ansiolíticos aumentam e agentes ansiogênicos diminuem as duas medidas (entrada

e permanência nos braços abertos). O efeito de ansiogênicos é mais difícil de demonstrar em alguns outros modelos (Lister, 1987; Graeff, 2005).

Os vários modelos animais de ansiedade que têm sido validados farmacologicamente utilizam os ansiolíticos clássicos benzodiazepínicos (BDZ), dentre os mesmos se destaca o diazepam, muito usado por ser potente e de ação rápida e duradoura, eles intensificam as ações do neurotransmissor *ácido γ aminobutírico* (GABA) no cérebro, principal transmissor inibitório do sistema nervoso central (Graeff, 1989). Foi observado que ratos e camundongos não tratados com drogas e submetidos a uma primeira testagem pelo labirinto em cruz elevado, apresentavam uma ausência do efeito das drogas ansiolíticas em uma posterior testagem, fenômeno que ficou conhecido como “*one trial tolerance*” (OTT) (Carobrez e Bertoglio, 2005; Lister, 1987).

Outro comportamento que é uma importante parte do repertório comportamental de roedores, sendo estudado e discutido pela literatura, e que sofre alterações de acordo com eventos ambientais, podendo ser sinalizador de ansiedade, é o chamado comportamento de auto-limpeza (*grooming*) (Berridge & Whishaw, 1992; Berridge, Fentress & Parr 1987; Van Erp, Kruk, Willekens-Bramer, Fermont & Nijssen, 1995). O *grooming* é um comportamento inato de cuidado corporal que é apresentado pela maioria das espécies animais (Fentress 1977, Kalueff & Tuohimaa, 2004, Kalueff & Tuohimaa, 2005). O *grooming* é um padrão natural de comportamento, com uma estrutura sequencial rica e fornece um campo frutífero para análises neuroetológicas (Berridge, 1990).

No estudo de Kalueff e Tuohimaa (2005), os autores apontam que as interrupções na atividade de *grooming* são consideradas como marcadores comportamentais de estresse em roedores, o fato de que os ratos expostos ao evento altamente estressor exibiram oito vezes mais interrupções no comportamento de *grooming*, especialmente durante a emissão na região denominada *rostral* (patas dianteiras, face e cabeça), confirma seu maior perfil de ansiedade em comparação com os ratos expostos a evento levemente estressor.

Ao buscarem correlações entre ansiedade e depressão no labirinto em cruz elevado e teste do nado forçado, respectivamente, Estanislau et al. (2011) encontraram um dado interessante sobre o *grooming* no labirinto, os ratos considerados mais ansiosos pelo teste, isto é, os que passaram menos tempo nos braços abertos do labirinto, foram os mesmos que mais se engajaram em *grooming*.

A alta ansiedade em ratos tem sido associada com frequentes encerramentos prematuros da sequência de *grooming* (Komorowska & Pisula, 2003).

O número de estudos que investigam a influência de diferentes contextos e diferenças individuais sobre o *grooming* ainda é pequeno. O estudo de Van Erp, Kruk, Meelis e Willekes-Bramer (1994) avaliou o efeito de vários estressores ambientais sobre o tempo, a variabilidade e forma do *grooming* em ratos, onde verificou como a força do estressor desencadearia mais padrões de *grooming*. Nenhum estressor foi mais eficaz do que a estimulação exteroceptiva (borrifar água) em induzir *grooming* imediato, visto que a função primária do *grooming* é limpeza. Porém os outros estressores testados não induziam imediatamente o *grooming*, produziam a supressão ou o atraso na sua emissão.

O estudo acima ainda descreve que o comportamento de *grooming* nos grupos com evento altamente estressor (derrota) foi suprimido imediatamente após a apresentação do evento. Os ratos expostos a um ambiente novo iniciam a emissão de *grooming* com baixa duração e aumentam gradualmente a mesma ao longo de 20 minutos (Van Erp et al. 1994). Os resultados do estudo de Estanislau (2012) que utilizou o comportamento de *grooming* para avaliar ansiedade no LCE indicaram que o prolongamento da sessão pode revelar efeitos que não são detectados em sessões de curta duração.

Por fim, a exposição ao LCE é considerada como um evento altamente estressor (Crawley et al., 1997; Crawley, 1999) e pode alterar o número e a duração dos episódios de *grooming*. Outros comportamentos como a aversão aos braços abertos do LCE são sinalizadores de ansiedade influenciados por fatores como, por exemplo, uma única ou múltiplas exposições ao labirinto (File, 1992; Griebel, Moreau, Jenck, Martin & Misslin, 1993; Treit, Menard & Royan, 1993).

Os resultados comportamentais dos estudos com animais expostos ao teste por cinco min. e posteriormente a uma segunda exposição, submetidos à injeção intraperitoneal de fármaco, mostram que as medidas convencionais do LCE não respondem ao fármaco, frente á isso o trabalho propõe analisar em sessões repetidas e prolongadas (30 min) se o comportamento de *grooming* está suscetível ao mesmo efeito observado com as medidas convencionais do LCE em sessões repetidas e se de alguma forma este comportamento pode ser utilizado como uma medida útil na análise de ansiedade, pois o *grooming* tanto pode ser uma resposta necessária para reduzir a excitação ou, alternativamente, pode ser apenas uma

repercussão de um comportamento que foi adiado pelo estressor e pode não sofrer efeito da OTT.

2 MÉTODO

2.1 SUJEITOS

Foram utilizados 98 ratos (76 ratos para o Experimento 1 e 22 ratos para o Experimento 2) machos albinos da linhagem Wistar com aproximadamente 250 - 300 g, obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram alojados em grupos de 4-6 ratos por gaiola e mantidos em condições de laboratório com comida e água *ad libitum* e o ciclo claro-escuro controlado (12-12 horas – luzes acesas às 07h00min). As gaiolas foram limpas três vezes por semana (nunca antes dos testes) e serragem de madeira foi usada como forração das caixas viveiros. A temperatura ambiente foi mantida entre 23 e 25 °C tanto no biotério como na sala de experimento e os testes realizados sempre entre as 14 e 18 horas. Nenhum procedimento foi realizado antes de um período de habituação de 3 dias no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC). Os experimentos foram conduzidos em um laboratório adjacente ao biotério e realizados em conformidade com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento e aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (processo 29267.2011.20).

2.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

2.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Foi utilizado um labirinto em cruz convencional feito de madeira, composto por dois corredores (braços) providos de paredes (fechados) e dois braços sem paredes (abertos). Todos os braços têm 50 cm de comprimento, 10 cm de largura. Os braços fechados tem paredes de 50 cm de altura, e os abertos tem bordas de acrílico de 1 cm. Todo o aparato fica 50 cm acima do piso da sala. Antes de cada rato ser testado, o labirinto foi limpo com solução de 5% de etanol e seco com toalhas de papel. A sala é iluminada por uma lâmpada incandescente de 60W que fica ao lado da filmadora que foi usada para gravar todas as sessões, ambas fixadas no teto da sala.

2.2.2 Drogas

Foram utilizadas a cafeína (100 mg/kg) e o diazepam (3 mg/kg) suspensos em salina estéril (0,9% NaCl). A administração das drogas e da salina (veículo) foi intraperitoneal (i.p), em um volume de 10 ml/kg.

As doses de cafeína e de diazepam foram definidas em estudo piloto e são semelhantes àquelas que alteram medidas convencionais do LCE em outros estudos (ver, por exemplo: Concas, Porcu, Sogliano, Serra, Purdy & Biggio, 2000; Françolin-Silva, Hernandez, Fukuda, Valadares & Almeida, 2006).

A curva do tempo da concentração plasmática do diazepam é bifásica: uma fase de distribuição inicial rápida e intensa (Cordioli et al., 2000), com uma meia-vida de 1.4 horas (Braun, Skelton, Vorhess & Williams, 2011) como demonstrado na Tabela 1.

2.3 PROCEDIMENTO

2.3.1 Experimento 1

O experimento 1 consistiu em três avaliações preliminares para se verificar o efeito das drogas sobre o comportamento dos sujeitos em diferentes intervalos entre administração e testagem. Foram utilizados 76 ratos, testados com os seguintes intervalos administração-teste: 20 min (n= 27); 35 min (n= 24); 45 min (n=25). O experimentador colocou o rato no aparato, com o focinho do animal virado para um dos braços fechados, e logo em seguida saiu da sala em que se encontra o LCE. Ao fim da sessão o rato era retirado do labirinto e alojado novamente na sua gaiola viveiro. Para este experimento, as categorias de comportamentos observadas foram as convencionalmente usadas no LCE, que são: tempo de permanência do sujeito no centro do LCE, número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados. A entrada em uma área do labirinto foi considerada quando o animal entrou com as quatro patas na mesma.

2.3.2 Experimento2

Os sujeitos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos; cafeína (n=8), diazepam (n=7) e salina (n=7) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição de sujeitos e drogas

Condição Experimental	Droga	Dosagem das drogas mg/kg	n° sujeitos	meia-vida em ratos
Droga Ansiogênica	Cafeína	100 mg/kg	08	3 h
Droga Ansiolítica	Diazepam	3 mg/kg	07	1.4 h
Grupo Controle	Salina (veículo)	10ml/kg	07	

A injeção ocorreu vinte minutos antes de cada sessão de exposição ao LCE. Os procedimentos sempre foram realizados pelo mesmo experimentador. Foram realizadas 3 sessões de exposição ao LCE, cada sujeito recebeu a mesma dosagem e da mesma droga e/ou salina em todas sessões. As sessões aconteceram com intervalos de 24 horas e cada uma teve a duração de 30 minutos sendo colocado e retirado como no exp. 1. Neste experimento investigou-se as categorias de comportamentos convencionais do LCE, assim como o comportamento de *grooming* (descritas a seguir).

2.4 CATEGORIAS DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING*

O *grooming* foi classificado entre dois tipos de elementos constituintes: (1) *grooming rostral* (lamber as patas dianteiras ou seu contato com aboca ou nariz e contato das patas dianteiras com a região da orelha e cabeça); (2) *grooming* corporal (lamber o tronco, patas traseiras, região genital e cauda). Foi registrada ainda a frequência de cadeias estereotipadas, padrão sequencial que se apresenta de forma harmoniosa e estruturada e consiste em uma sequencia de direção linear que começa na cabeça e se estende em sentido cefalocaudal, sem interrupção. Intervalos maiores do que 5s foram considerados separar dois episódios diferentes. Intervalos menores que 5 s entre emissões do comportamento de *grooming* foram considerados interrupções dentro de um mesmo episódio.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada uma análise estatística Shapiro-Wilk's W Test de forma preliminar para verificação de normalidade em cada sessão. Caso a análise apontasse normalidade, os dados eram analisados com análise de variância (ANOVA) de uma via (One Way) e, quando necessário, um teste post hoc Dunnett era utilizado.

Se as análises mostrassem que não houve normalidade, os dados eram submetidos a uma análise não-paramétrica: um teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes e, caso fosse atingido o índice de significância, cada grupo tratado com droga era comparado ao tratado com salina por meio do Mann-Whitney U Test.

Todos os resultados estão expressos em média +/- erro padrão da média. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$.

Uma análise preliminar (ANOVA de uma via) mostrou que os grupos salina correspondentes aos diferentes intervalos administração-teste não diferiram entre si. Por isso, tais grupos foram fundidos para realização das subseqüentes análises estatísticas. Dessa forma, o grupo salina será demonstrado em todas as figuras do primeiro experimento somente em uma coluna.

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1

O Shapiro-Wilk's W Test não apontou normalidade para os dados da porcentagem de entrada em braços abertos no LCE. Portanto um teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes foi utilizado e demonstrou índice de significância ($H[6,90] = 20,44$, $p = 0,002$). Então, o Mann-Whitney U Test indicou que a porcentagem de entradas em braços abertos dos animais tratados com diazepam 20 minutos antes da exposição de cinco minutos ao LCE ($p = 0,03$), e 45 minutos antes da exposição ($p = 0,03$) foi significativamente maior que a do grupo salina. Por outro lado, o grupo administrado com cafeína 35 minutos antes da exposição ($p = 0,006$) apresentou média significativamente menor que a do grupo salina, como demonstrado na Figura 1A.

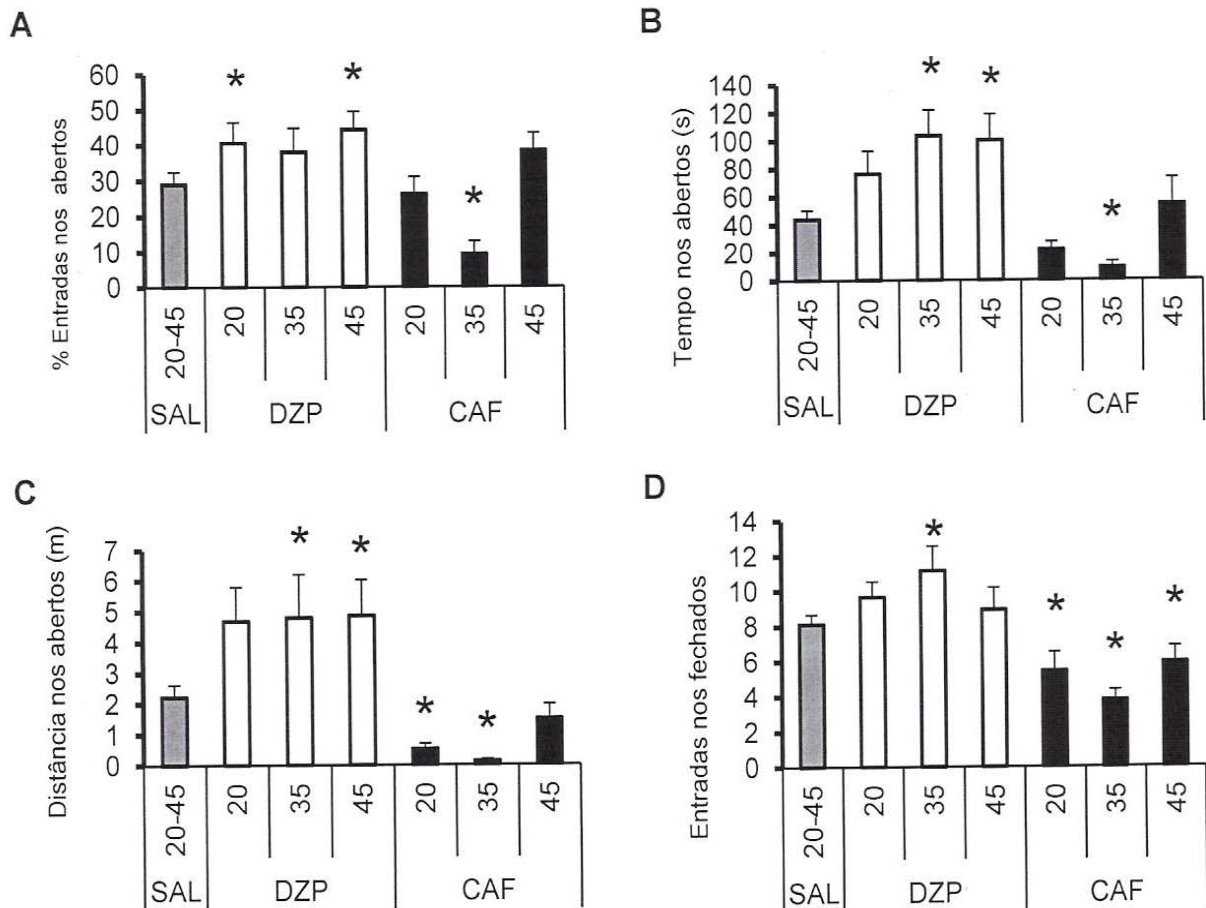
O tempo de permanência em braços abertos não apontou normalidade e devido à isso esses dados também foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes, o qual indicou significância ($H[6,90] = 30,75$, $p = 0,001$). O Mann-Whitney U Test indicou que os tempos de permanência em braços abertos dos grupos tratados 35 e 45 minutos antes da exposição ao LCE com diazepam foram significativamente maiores que o grupo salina ($p < 0,01$), como demonstrado na Figura 1B. O tratado com cafeína 35 minutos antes da exposição ($p = 0,01$) foi significativamente menor que o do grupo salina.

Em relação à distância percorrida nos braços abertos, não houve normalidade e o teste Kruskal-Wallis ANOVA ($H[6,90] = 30,78$, $p = 0,001$) levou à necessidade do Mann-Whitney U Test. Esse indicou que a distância percorrida em braço aberto para o tratamento com diazepam 35 e 45 minutos antes da exposição ao LCE ($p = 0,05$) foi significativamente maior do que a do grupo salina. As distâncias apresentadas pelos grupos tratados com cafeína 20 e 35 minutos antes da exposição ($p = 0,02$ e $p = 0,003$, respectivamente) foram significativamente menores que a do grupo salina, como demonstrado na Figura 1C.

As entradas nos braços fechados do LCE não apresentaram normalidade. O teste Kruskal-Wallis ANOVA indicou significância ($H[6,90] = 30,46$, $p = 0,001$) para essa variável. O Mann-Whitney U Test apontou que os grupos tratados

com cafeína 20, 35 e 45 minutos antes da exposição ao LCE ($p = 0,004$, $p = 0,0003$, $p = 0,04$, respectivamente) apresentaram menos entradas em braços fechados que o grupo salina. No grupo tratado com diazepam 35 minutos antes da exposição ($p = 0,05$) observou-se número de entrada em braço fechado significativamente maior do que o do grupo salina, como demonstrado na Figura 1D.

Figura 1 – Efeito do Diazepam (DZP=3 mg/kg) e Cafeína (CAF=100 mg/kg) sobre as medidas convencionais do Labirinto em Cruz Elevado nas três condições experimentais de exposição (20 min. 35 min. e 45 min. de intervalo entre administração e teste). *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina (Mann-Whitney U test)



O tempo no centro do LCE não apresentou normalidade. O teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes, por seu turno, não demonstrou diferenças significativas ($H[6,90] = 3,70$, $p = 0,7162$) (os dados não são mostrados).

3.2 EXPERIMENTO 2: MEDIDAS DE *GROOMING*

No Experimento 2, ratos foram tratados com salina, diazepam ou cafeína e, 20 min depois, foram testados por 30 min no LCE. Os resultados das medidas de *grooming* são mostrados a seguir. 11

A Figura 2A mostra o número de episódios de *grooming*. As três sessões passaram no teste de normalidade. Na primeira sessão a ANOVA apontou efeito do fator droga ($F_{[2,19]} = 3,85$; $p = 0,003$), porém as comparações post hoc Dunnett não demonstraram índice de significância para alguma droga (embora tenha havido uma tendência de queda no grupo diazepam, $p = 0,07$). Na segunda sessão a ANOVA foi significativa ($F_{[2,19]} = 6,92$; $p = 0,006$). O teste post hoc demonstrou diminuição significativa somente para o grupo tratado com diazepam ($p = 0,02$) em relação ao grupo controle. Na terceira sessão também a ANOVA foi significativa ($F_{[2,19]} = 12,03$; $p = 0,005$). As comparações post hoc demonstraram aumento significativo para o grupo tratado com cafeína ($p = 0,04$) e diminuição significativa para o tratado com diazepam ($p = 0,05$) em relação ao grupo controle.

Em relação à duração total de *grooming*, os dados estão expostos na Figura 2B. A primeira sessão não apresentou distribuição normal, a análise não-paramétrica foi realizada com o teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes, o qual demonstrou efeito significativo ($H[2,22] = 10,88$, $p = 0,005$). Portanto, os dados também foram submetidos ao Mann-Whitney U Test de duas medidas independentes (droga X salina), que demonstrou significância para os tratamentos com diazepam ($p = 0,001$) e com cafeína ($p = 0,05$). Ambos os grupos passaram significativamente menos tempo engajados em *grooming* do que o grupo controle. Nas segunda e terceira sessões os dados mostraram normalidade e a ANOVA de uma via apontou significância para o fator droga: ($F_{[2,19]} = 7,28$; $p = 0,005$) e ($F_{[2,19]} = 9,17$; $p = 0,001$), respectivamente. As comparações post hoc indicaram uma diminuição significativa somente para o grupo diazepam em relação ao grupo controle e em ambas as sessões com o mesmo índice de significância $p = 0,01$.

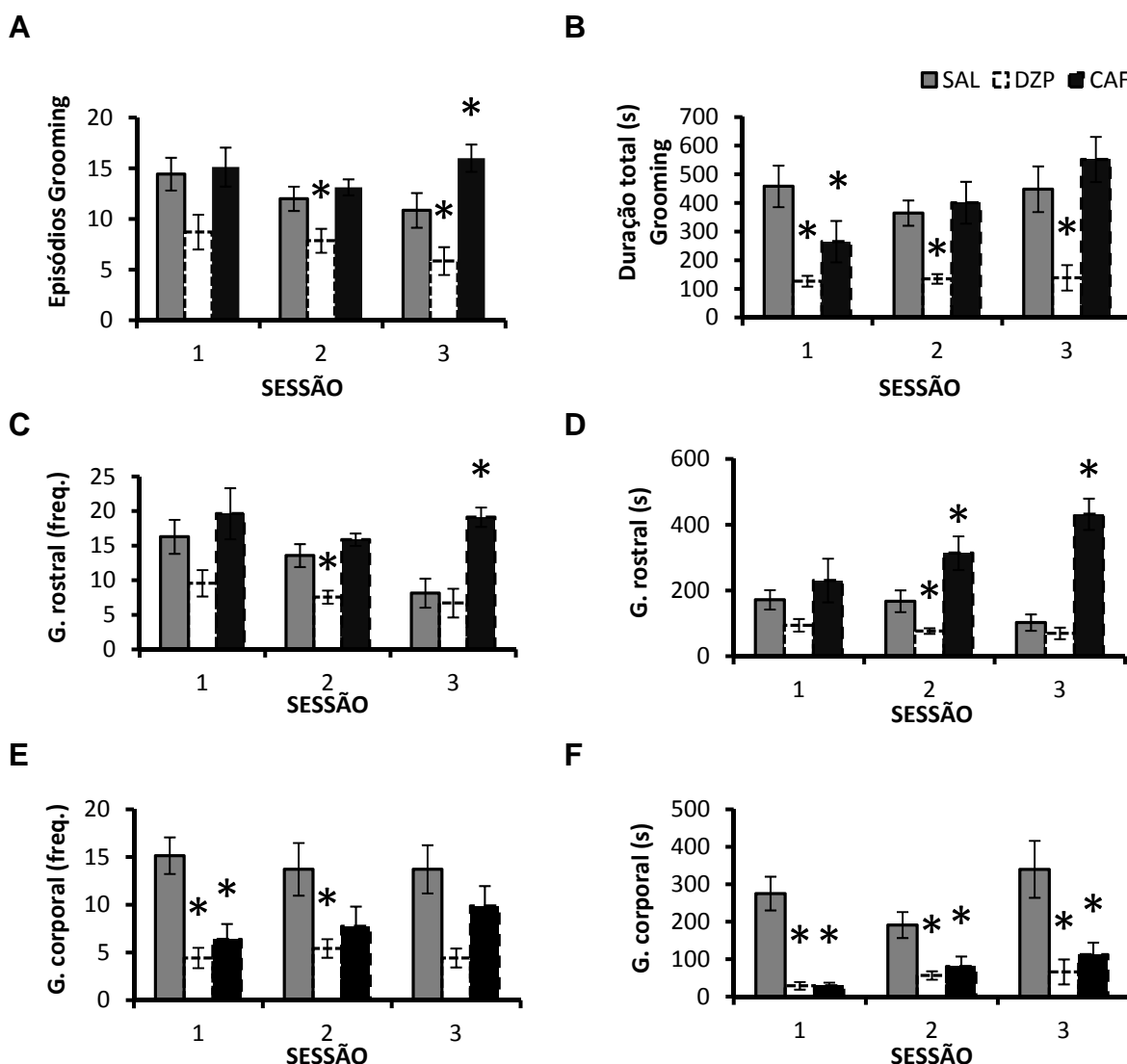
Quanto às cadeias estereotipadas de *grooming*, observou-se que em nenhuma das sessões os critérios de normalidade foram alcançados com o Shapiro-Wilk's W Test. As análises não paramétricas com o teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes também não apontaram índices de significância na

primeira ($H[2,22] = 2,98$, $p = 0,22$), na segunda ($H[1,14] = 0,89$, $p = 0,34$) e tampouco na terceira sessão ($H[2,22] = 0,92$, $p = 0,62$).

Quanto às interrupções por minuto do comportamento de *grooming*, somente na primeira sessão observou-se normalidade, mas a ANOVA de uma via não apontou diferenças significativas ($F_{[2,19]} = 0,61$; $p = 0,55$). Na segunda e na terceira sessão, não houve normalidade e a análise não-paramétrica com o teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes não apontou índices de significância (Segunda sessão: $H[2,22] = 0,82$, $p = 0,66$; Terceira sessão: $H[2,22] = 0,83$, $p = 0,65$).

A frequência do comportamento de *grooming rostral* (Figura 2C) teve normalidade nas três sessões de exposição ao LCE. Porém, na primeira sessão, a ANOVA de uma via não foi significativa, mostrou somente uma tendência para o fator droga ($p = 0,06$).

Figura 2 – Efeito do Diazepam (DZP=3 mg/kg) e Cafeína (CAF=100 mg/kg) em relação às medidas de grooming em cada sessão de exposição de 30 min. ao LCE, na condição de intervalo de 20 min. entre administração e teste. *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina



Já na segunda sessão, o fator droga teve significância ($F_{[2,19]} = 12,89$; $p = 0,0002$) e as comparações post hoc demonstraram que o grupo tratado com diazepam apresentou uma diminuição significativa ($p = 0,004$) em relação ao grupo controle. Na terceira sessão, o fator droga novamente teve significância ($F_{[2,19]} = 14,06$; $p = 0,0001$) e a análise post hoc demonstrou que o grupo cafeína teve uma frequência significativamente maior ($p = 0,0008$) que a do grupo controle.

Quanto aos dados da duração do comportamento de *grooming rostral*, os critérios de normalidade não foram alcançados em nenhuma das três sessões de exposição ao LCE. Na primeira sessão a análise não-paramétrica com o teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes não apontou

índices de significância ($H[2,22] = 5,33$, $p = 0,07$). O teste na segunda sessão demonstrou significância ($H[2,22] = 14,98$, $p = 0,007$) e a submissão dos dados ao Mann-Whitney U Test apontou índice para o grupo diazepam ($p = 0,002$) significativamente menor do que o grupo controle, e cafeína ($p = 0,04$) significativamente maior do que o grupo controle. Já na terceira sessão, o Kruskal-Wallis ANOVA apontou significância ($H[2,22] = 15,50$, $p = 0,005$) e somente o grupo tratado com cafeína demonstrou diferença significativamente maior ($p = 0,0003$) do que o grupo controle no Mann-Whitney U Test, como demonstrado na Figura 2D.

A frequência do comportamento de *grooming* corporal está demonstrada na Figura 2E. Na primeira sessão, os dados tiveram normalidade e a ANOVA mostrou índice de significância para o fator droga ($F_{[2,19]} = 12,56$; $p = 0,0003$). As comparações post hoc mostraram que o grupo diazepam e o grupo cafeína tiveram diminuição significativa ($p = 0,0003$ e $p = 0,001$, respectivamente) em relação ao grupo controle. Na segunda sessão o critério de normalidade não foi alcançado e a análise não-paramétrica Kruskal-Wallis ANOVA indicou significância ($H[2,22] = 6,91$, $p = 0,03$). Na análise do Mann-Whitney U Test, somente o grupo diazepam atingiu significância ($p = 0,004$), apresentando frequência menor que o grupo controle. Na terceira sessão de exposição novamente a normalidade dos dados não foi alcançada e na análise não-paramétrica Kruskal-Wallis ANOVA também não houve significância ($H[2,22] = 5,62$, $p = 0,06$).

O tempo de duração da emissão de *grooming* corporal não teve normalidade nas três sessões. Na análise não paramétrica Kruskal-Wallis ANOVA, houve significância na primeira ($H[2,22] = 13,70$, $p = 0,01$), segunda ($H[2,22] = 9,34$, $p = 0,009$) e terceira sessões ($H[2,22] = 7,76$, $p = 0,02$). Em seguida, a análise com o Mann-Whitney U Test aplicado para comparações droga X salina mostrou que as duas drogas, em todas as sessões, resultaram em durações significativamente menores, como mostra a Figura 2F (Na primeira sessão: grupo diazepam, $p = 0,0005$ e o grupo cafeína, $p = 0,0003$. Na segunda sessão: grupo diazepam, $p = 0,001$ e o cafeína, $p = 0,02$. Na terceira sessão: grupo diazepam, $p = 0,02$ e o grupo cafeína, $p = 0,009$).

3.3 MEDIDAS CONVENCIONAIS

Os resultados das medidas convencionais do LCE no Experimento 2, onde os ratos foram tratados com salina, diazepam ou cafeína e, 20 min depois, foram testados por 30 min no LCE, estão descritos a seguir.

Os dados das três sessões, Tabela 2, em relação à porcentagem de entradas em braço aberto do LCE foram submetidos ao tratamento estatístico e na primeira sessão a ANOVA apontou efeito do fator droga ($F_{[2,19]} = 3,94$; $p = 0,03$), porém as comparações post hoc Dunnett não demonstraram índice de significância para alguma droga (embora tenha havido uma tendência de aumento no grupo diazepam, $p = 0,06$). Na segunda e terceira sessões o Shapiro-Wilk's W Test não apontou normalidade para os dados da porcentagem de entrada em braços abertos no LCE entre as condições experimentais, portanto um teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas independentes foi utilizado e demonstrou que na segunda ($H[2,22] = 0,49$, $p = 0,78$) e na terceira ($H[2,22] = 4,28$, $p = 0,11$) não houve índice de significância.

Em relação ao tempo de permanência em braço aberto os dados da primeira sessão não apontaram normalidade com o Shapiro-Wilk's W Test, então foi utilizado o Kruskal-Wallis ANOVA que apontou significância ($H[2,22] = 9,31$, $p = 0,009$) e as comparações post hoc sinalizaram índice de significância para os ratos tratados com diazepam $p = 0,03$, os quais passaram significativamente mais tempo em braço aberto do que os tratados com salina, como demonstrado na Tabela 2. Na segunda e terceira sessões o tratamento estatístico não demonstrou normalidade e a análise do Kruskal-Wallis ANOVA tanto da segunda ($H[2,22] = 1,23$, $p = 0,54$) quanto da terceira sessão ($H[2,22] = 4,61$, $p = 0,09$) não apontaram índices de significância.

Os dados da distância percorrida em braço aberto do LCE nas três sessões de exposição foram levados ao Shapiro-Wilk's W Test e em nenhuma das sessões foi observado normalidade dos dados e a submissão dos dados ao Kruskal-Wallis ANOVA da primeira ($H[2,22] = 1,91$, $p = 0,38$), da segunda ($H[2,22] = 2,54$, $p = 0,28$) e da terceira sessões ($H[2,22] = 2,01$, $p = 0,36$) não apontaram índices de significância.

Outra medida convencional do LCE é o número de entradas em braço fechado, demonstrado na Tabela 2. Nessa medida o tratamento estatístico

inicial não apontou normalidade e na análise não paramétrica Kruskal-Wallis ANOVA também não houve significância na primeira ($H[2,22] = 4,57$, $p = 0,10$), segunda ($H[2,22] = 2,30$, $p = 0,31$) e terceira ($H[2,22] = 5,44$, $p = 0,06$) sessões.

A análise estatística do tempo de permanência no centro do LCE demonstrou que em nenhuma das sessões os critérios de normalidade foram alcançados com o Shapiro-Wilk's W Test, e a análise não paramétrica com o teste Kruskal-Wallis ANOVA de múltiplas medidas também não apontou índices, ver Tabela 2, de significância na primeira ($H[2,22] = 1,91$, $p = 0,38$), nem na segunda ($H[2,22] = 2,54$, $p = 0,28$) tampouco na terceira ($H[2,22] = 2,01$, $p = 0,36$) sessão.

Tabela 2 – Efeito do Diazepam (DZP=3 mg/kg) e Cafeína (CAF=100 mg/kg) sobre as medidas convencionais de análise do LCE em cada sessão de exposição de 30 min. na condição de intervalo de 20 min. entre administração e teste

Medida	Sessão	Salina	Diazepam	Cafeína
Entradas nos abertos (%)	1	21,4 ± 3,1	38,8 ± 5,7	19,1 ± 6,3
	2	10,2 ± 7,0	13,1 ± 5,6	11,4 ± 6,9
	3	11,4 ± 6,7	5,7 ± 5,7	0,0 ± 0,0
Tempo nos abertos (s)	1	38,6 ± 13,7	97,1 ± 17,6*	19,7 ± 9,0
	2	13,7 ± 8,6	32,2 ± 16,4	8,6 ± 4,8
	3	81,2 ± 62,2	8,4 ± 8,4	0,0 ± 0,0
Distância nos abertos (m)	1	2,1 ± 0,7	2,2 ± 0,6	0,8 ± 0,5
	2	0,4 ± 0,3	1,0 ± 0,6	0,5 ± 0,3
	3	2,7 ± 1,9	0,4 ± 0,4	0,0 ± 0,0
Entrad. fechados. (freq)	1	13,3 ± 3,1	10,1 ± 2,5	6,0 ± 1,0
	2	8,3 ± 3,8	8,3 ± 2,0	4,0 ± 1,1
	3	13,0 ± 4,8	6,1 ± 1,0	2,9 ± 0,8
Tempo no centro (s)	1	64,8 ± 18,7	102,6 ± 17,5	113,2 ± 36,2
	2	53,3 ± 35,3	125,6 ± 93,2	16,4 ± 6,7
	3	80,9 ± 35,9	24,7 ± 10,1	10,2 ± 4,1

*, $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina.

4 DISCUSSÃO

O principal objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de uma droga ansiolítica e de uma ansiogênica sobre as medidas convencionais do labirinto em cruz elevado e sobre o comportamento de *grooming*, a fim de avaliar se esse pode prover alguma medida que possa ser útil na avaliação de ansiedade. Para tanto, em primeiro lugar, os efeitos ansiolítico e ansiogênico das drogas foram testados em sessões de 5 min dentro do período entre 20 e 50 minutos (período que compreende os 30 min de sessão no segundo experimento) após sua administração. Esse experimento indicou a presença de efeitos das drogas durante todo (diazepam) ou quase todo (cafeína) o período. No segundo experimento, ratos foram testados em três sessões com duração de 30 min cada. Das medidas convencionais, somente na primeira sessão de exposição prolongada foi detectado o efeito no tempo de permanência em braço aberto dos ratos tratados com diazepam, nenhuma outra medida convencional em qualquer sessão de 30 min apresentou efeito ansiolítico ou ansiogênico. Dentre as medidas de *grooming*, a frequência de episódios na terceira sessão e a duração do componente rostral na segunda sessão mostraram sensibilidade bidirecional ao diazepam e a cafeína.

Os resultados do primeiro experimento mostraram que o efeito ansiolítico do diazepam foi confirmado em diferentes momentos dentro do período entre 20 e 50 min depois da administração das drogas, em exposições de 5 min ao LCE. Esse efeito foi detectado na porcentagem de entrada em braço aberto, com os sujeitos tratados 20 min antes do teste, no tempo de permanência em braço aberto e na distância percorrida em braço aberto, nos testes 35 e 45 min após o tratamento, na porcentagem de entrada, tempo de permanência e distância percorrida em braço aberto. Gonzalez e File (1997), trataram ratos com benzodiazepínico diretamente no núcleo dorsal da rafe e apontaram efeito no aumento do tempo gasto nos braços abertos, que está de acordo com o que foi encontrado em dois dos três intervalos do presente experimento e nenhum efeito foi detectado no número de entradas nos braços fechados, também identificada em dois dos três intervalos do presente estudo. No estudo de Françolin-Silva et al. (2006), o objetivo foi investigar os efeitos do diazepam no comportamento de ratos submetidos à desnutrição proteica precoce e a reatividade ao diazepam. Várias dosagens foram testadas e os sujeitos bem nutridos tratados com 1, 2 e 4 mg/kg da droga demonstraram diferença significativa

com relação ao número de entrada em braço aberto, resultado que se apresentou em duas das três condições deste experimento. Os dados obtidos neste experimento são consistentes com os estudos que mostram efeitos ansiolíticos do diazepam em medidas convencionais do LCE.

O efeito ansiogênico da cafeína se mostrou forte no período intermediário (35 min) de tempo entre o tratamento e a exposição e enfraqueceu no tempo maior (45 min) entre o tratamento e o teste. Na exposição após 20 min foi detectado efeito na distância percorrida em braço aberto e nas entradas em braços fechados, após 35 min foi detectado em todas as medidas e após 45 min foi detectado somente em relação à atividade locomotora (entradas em braço fechado). Esse último resultado sinaliza que, devido ao tempo entre administração da droga e teste, o efeito ansiogênico da cafeína tendeu a esvanecer. Diversos estudos (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985; Bhattacharya, Satyan & Chakrabarti, 1997; Jain, Hirani & Chopde, 2005) demonstram que a ação ansiogênica da cafeína em ratos tratados com doses mais elevadas (50 ou 100 mg/kg) fica evidenciada a partir da diminuição na exploração dos braços abertos quando os ratos foram tratados até 30 min antes do teste. O presente estudo demonstrou nos três períodos diferenciados de exposição uma diminuição significativa de entradas em braços fechados em relação ao grupo controle, o que difere do estudo de Bhattacharya et al. (1997), que aponta (com dose de 50 mg/kg) aumento no número de entradas em braço fechado, mas coincide com o estudo de Braun et al. (2011), que testaram agentes ansiolíticos e ansiogênicos, demonstrando tanto a diminuição da exploração dos braços abertos quanto do número de entrada em braço fechado em sujeitos tratados com cafeína. Sendo esta última a única variável dependente que sinalizou tal efeito nas três condições deste experimento.

Medidas convencionais do LCE demonstraram no segundo experimento que o efeito ansiolítico do diazepam foi detectado somente na primeira sessão de exposição em relação ao tempo de permanência em braço aberto, que foi maior que o do grupo controle. Porém, nenhum outro efeito (ansiolítico ou ansiogênico) foi detectado em qualquer outra sessão, o que já era esperado, pois as medidas convencionais são suscetíveis a OTT e, portanto, os seus dados não correspondem aos resultados de efeito ansiolítico ou ansiogênico de apenas uma exposição de cinco minutos. Tais efeitos são mais confiavelmente esperados somente nos cinco primeiros minutos da primeira exposição, como no estudo de

Gonzalez e File (1997), em que estes efeitos não são mais encontrados ao testar animais com 5 min de exposição prévia ao LCE e tratados com benzodiazepínicos. Há pouca evidência de que a habituação motora seja a explicação para a redução dos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos em período maior ou numa segunda exposição (Dawson, Crawford, Stanhope, Iversen & Tricklebank, 1994). A ideia de que exposições maiores e repetidas evocam maior medo/ansiedade é suportada (Rodgers & Shepherd, 1993) pela menor porcentagem de tempo gasto em braço aberto. O que demonstra a fragilidade de se tomar as medidas convencionais do LCE como sinalizadores de ansiedade em sessões repetidas e extendidas.

O segundo experimento que é dedicado à avaliação do comportamento de *grooming* demonstrou sua utilidade como um marcador de ansiedade. O número de episódios do comportamento de *grooming* dos ratos tratados com diazepam na presente pesquisa foi significativamente menor que o do grupo controle em duas das três sessões. A duração total foi menor nas três exposições, estes dados são semelhantes com os de estudos que demonstram a supressão de tempo engajado no comportamento de *grooming* em animais sob efeito de diazepam (Dunn, Guild, Kramarcy & Ware, 1981; Cremer, Barioglio, Civallero & Celis, 1995; Kudryavtseva & Bondar, 2002; Spasojević, Gavrilović, Varagić & Dronjak, 2007; Hernández & Guasti, 2011, Nin et al., 2012). Portanto, os resultados da presente pesquisa vão ao encontro dos resultados da literatura em relação ao número de episódios e duração total de emissão do comportamento de *grooming*.

A diminuição do tempo engajado em *grooming* é considerada uma medida que sinaliza o efeito ansiolítico da droga (Barros, Tannhauser, Tannhauser & Tannhauser, 1992; 1994), portanto o número de episódios e a duração deles parecem ser parâmetros úteis na observação de alterações em função do tratamento com alguma droga (Ninet et al., 2012).

Apesar disso, alguns estudos discorrem sobre o *grooming* como medida que não produziu efeito ou que não foi confiável. Van Erp et al. (1994) avaliaram *grooming* em ratos sob diferentes condições estressoras, e discutem salientando que seus resultados não suportam a hipótese de que a execução do *grooming* seja essencial para reduzir a excitação após situações de estresse. Na pesquisa de Garcia (2004), foram testadas drogas ansiolíticas e ansiogênicas e observadas medidas convencionais e o *grooming*, e com a droga ansiogênica

(caféina) não foram encontradas diferenças significativas para a medida do *grooming*, já com a droga ansiolítica (clordiazepóxido), foi identificado um tempo menor de emissão. Porém, tais estudos utilizaram sessões de cinco minutos de exposição ao LCE, o que pode ter sido o fator contribuinte para a fragilidade nas medidas desse comportamento.

A opção pela extensão da exposição ao LCE está diretamente relacionada com as características da interação que ocorre entre as condições de ambiente e o comportamento de *grooming*. No estudo de Estanislau (2012), os comportamentos de *grooming* que sinalizam ansiedade induzidos pelo confinamento dos sujeitos em braço aberto do LCE só foram detectados na segunda metade de um teste de dez minutos, sinalizando que a condição de ansiedade é um fenômeno que aumenta com o tempo. Van Erp et al., (1994) somente perceberam um aumento na emissão do *grooming* depois de um período de atraso de 20 min, quando os animais estavam na condição de derrota por outro rato da mesma espécie, salientando que o atraso se dá devido à força do evento estressor. Portanto, a duração da exposição ao teste pode ser um fator importante para resultados mais confiáveis na detecção dos efeitos ansiogênicos no LCE sobre o comportamento de *grooming*, especialmente considerando que a habituação ao aparato experimental ocorre mesmo no decorrer de um teste de cinco minutos (Bolivar, 2009; Carobrez & Bertoglio, 2005).

Exposições repetidas em LCE para observação do comportamento de *grooming*, normalmente não são utilizadas, porém Van Erp et al. (1994) utilizaram exposições repetidas a diferentes condições de estresse e os dados demonstraram que não houve aumentos ou diminuições significativas em relação ao controle com as repetições de exposição. Porém, no presente estudo, somente na terceira sessão de exposição o número de episódios dos ratos tratados com caféina foi significativamente maior do que o grupo controle, o que sinaliza uma condição ansiogênica. Portanto, neste estudo as exposições repetidas se mostraram úteis para uma melhor identificação das condições ansiolíticas e ansiogênicas avaliadas através do comportamento de *grooming*, já que este comportamento nestas condições, aparentemente não está suscetível aos efeitos da OTT que ocorre com as medidas convencionais do LCE.

Outros dados que suportam a utilidade das exposições repetidas foram a detecção da condição ansiogênica da caféina somente na terceira sessão

de exposição em relação a frequência da emissão do comportamento de *grooming* rostral, mas não na primeira, tampouco na segunda, e o total de tempo da emissão do *grooming* rostral sob tratamento da droga ansiogênica foi detectada na segunda e terceira, mas não na primeira sessão de exposição.

O comportamento de *grooming rostral* pode ser uma medida útil como marcador de ansiedade devido à droga ansiogênica neste estudo ter aumentado significativamente a duração deste comportamento na segunda e terceira sessões e a frequência de emissão na terceira sessão de exposição em relação ao grupo controle, além disso a droga ansiolítica diminuiu significativamente suas frequência e duração na segunda sessão em relação ao grupo controle. Estes dados vão no mesmo sentido que estudos que apontam a tendência de que o *grooming rostral* pode se constituir como uma medida útil a ser considerada na avaliação de ansiedade. Estanislau (2012) avaliou o *grooming* em diferentes condições e percebeu um aumento particularmente do *grooming rostral* numa condição de ansiedade que foi o confinamento dos sujeitos em braço aberto do LCE. A duração do *grooming rostral*, no mesmo estudo, foi correlacionada negativamente com a porcentagem de entradas em braço aberto na condição de não confinamento em algum braço específico. Portanto, aparentemente, quanto menos ansiedade, menor a emissão do *grooming rostral*, o que concorda com os dados da presente pesquisa.

Em relação ao *grooming* corporal, os dados não suportam sua utilidade para identificação de condição ansiolítica ou ansiogênica. Estanislau, Díaz-Morán, Cañete, Blásquez, Tobeña & Fernández-Teruel (Manuscrito em preparação) num estudo que avalia o *grooming* em diferentes cepas de ratos e em diferentes condições, discute que sessões curtas não são suficientes para que o *grooming* corporal apresente seus efeitos, porém na presente pesquisa mesmo com sessões de longa duração os dados demonstram que o tempo emitindo este comportamento em todas as sessões sob efeito da droga ansiolítica ou da ansiogênica foi significativamente menor em comparação ao grupo controle e a frequência desse comportamento foi menor na primeira sessão em ambas as condições e na segunda sessão na condição ansiolítica. Tendo em vista que cada droga exerce seus efeitos por meio de alterações neurobiológicas distintas, essa diminuição sob efeito de qualquer das drogas provavelmente se dá por mecanismos diferenciados de ação.

Devido às medidas convencionais do LCE nas sessões prolongadas ter mostrado diferença significativamente menor para droga ansiolítica somente na primeira sessão de exposição e a droga ansiogênica não ter apresentado efeito em nenhuma sessão de qualquer medida convencional de análise, pode-se dizer que essas medidas não ajudaram na análise da ansiedade em sessões repetidas e prolongadas. Possivelmente por serem suscetíveis à OTT.

Dessa forma, os dados apontam para a conclusão de que o *grooming*, principalmente a frequência de episódios na terceira sessão e o componente *rostral* na segunda sessão de exposição, se apresentaram enquanto medidas úteis, podendo ser utilizados como confiáveis na avaliação de ansiedade em ratos, por apresentar sensibilidade bidirecional ao diazepam e a cafeína.

Caso a avaliação da ansiedade seja realizada através da análise do comportamento de *grooming*, o estudo concluiu que as sessões prolongadas permitem uma completa expressão dos efeitos sutis sobre ele, que normalmente não são detectadas em sessões curtas devido ao atraso na emissão deste comportamento de acordo com a força do evento estressor a ser estudado na interação com esse comportamento. A repetição da exposição sinalizou a detecção de vários efeitos sobre o *grooming* que não foram detectados na primeira passagem e portanto repetir exposições nas análise do comportamento de *grooming* proporcionou um melhor e mais claro entendimento dos efeitos da interação que este comportamento estabelece com os eventos a serem estudados.

REFERÊNCIAS

- BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A.; TANNHAUSER, M. (1992). Effect of sodium valproate on the open-field behavior of rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 281–287.
- BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A.; TANNHAUSER, M. (1994). The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 339–344.
- 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.; FENTRESS, J. C.; PARR, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behav Brain Res* 23:59–68.
- BERRIDGE, K. C.; WHISHAW, I. Q. (1992). Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a *grooming* sequence. *Exp Brain Res.* 275–90.
- BHATTACHARYA, S. K.; SATYAN, K. S.; CHAKRABARTI, A. 1997. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J. Psychopharmacol.* 11, 219 e 224.
- BOLIVAR, V. J. (2009). Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiol Learn Mem* 92:206–214.
- BRAUN, A. A; SKELTON, M. R; VORHEES, C. V; WILLIAMS, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague–Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 97, 406–415.
- CAROBREZ, A. P; BERTOGLIO, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav Rev* 29:1193–1205.
- CONCAS, A.; PORCU, P.; SOGLIANO, C.; SERRA, M.; PURDY, R. H.; BIGGIO, G. 2000. Caffeine-induced increases in the brain and plasma concentration of neuro active steroids in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 39e45.
- CORDIOLI, A. *et al.* *Psicofármacos*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- CRAWLEY, J. N; BELKNAP, J. K; COLLINS, A; CRABBE, J. C; FRANKEL, W; HENDERSON, N; HITZERMANN, R. J; MAXSON, S. C; MINER, L. L; SILVA, A. J; WEHNER, J. N; WYNshaw-BORIS, A; PAYLOR, R. (1997). Behavioural phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology* 132, 107–124.
- CREMER, C; BARIOGLIO, S. R. de; CIVALLERO, C.; CELIS, M. E. (1995). *a-MSH-induced behavior: Changes afer diazepam and buclofenadminhation related with cyclic AMP levels.* *PEPTIDES* 16(5) 821-825.

CRUZ, A. P. M.; JÚNIOR, H. Z.; GRAEFF, F. G.; FERNANDEZ, J. L. (1997). Modelos Animais de Ansiedade: Implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. *Psicologia Teoria e Pesquisa*. Set-Dez. vol. 13, n. 3. PP 269-278.

DAWSON, G. R.; S. P.; K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. (1994). One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to the locomotor habituation, not repeated drug exposure. *Psychopharmacology*, 113: 570-572.

DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. (1981). *Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or B-endorphin*. *PHARMAC. BIOCHEM. BEHAV.* 15(4) 605-608.

ESTANISLAU, C.; RAMOS, A. C.; FERRARESI, P. D.; COSTA, N. F.; DE CARVALHO, H. M. & BATISTELA, S. (2011). Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. *Behavioural Processes*, 86, 46-51.

ESTANISLAU, C. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5, 1, 105 – 112.

ESTANISLAU, C.; DÍAZ-MORÁN, S.; CAÑETE, T.; BLÁSQUEZ, G.; TOBEÑA, A.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Differences in grooming behavior depend on the test situation: a comparison among the NIH heterogeneous stock of rats and the Roman rat strains. Manuscrito em preparação.

FENTRESS, J. C. (1977). The tonic hypothesis and the patterning of behaviour. *Ann NY Acad Sci*;290:370–94.

FILE, S. E. (1990). One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, 100: 281-282.

FILE, S. E. (1992). Behavioral Detection of Anxiolytic Action. In: Elliott, J. M.; Heal, D. J.; Mardsen, C. A. *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. John Wiley & Sons Ltd.

FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; HERNANDES, A. S.; FUKUDA, M. T. H.; VALADARES, C. T.; ALMEIDA, S. S. (2006). Anxiolytic-like effects of short-term postnatal protein malnutrition in the elevated plus-maze test. *Behavioural Brain Research* 173, 310 – 314.

GARCIA, A. M. B. (2004). Efeitos Farmacológicos de Drogas ditas Ansiolíticas e Ansiogênicas Administradas em Ratos Testados em Labirinto em Cruz Elevado na Presença e Ausência de Luminosidade. Dissertação de Mestrado, FFCLRP/USP, 25p.

GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. (1997). A Five Minute Experience in the Elevated Plus-Maze Alters the State of the Benzodiazepine Receptor in the Dorsal Raphe Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 17(4):1505–1511.

GRAEFF, F. G. (1989). *Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação*. 2a Ed. revista. e ampliada. São Paulo, SP; EPU.

GRAEFF, F. G. (2005). Medicamentos ansiolíticos In: Graeff, F. G.; Guimarães, F. S. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo, SP. Editora Atheneu.

HANDLEY, S.L. & MITHANI, S. (1984). Effects of α -adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* 327, 1–5.

HERNÁNDEZ, S. O; GUASTI, A. F.(2011). Sex differences in the burying behavior test in middle-aged rats: Effects of diazepam. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 99, 532–539.

JAIN, N. S; HIRANI, K; CHOPDE, C. T. (2005). Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3- α -hydroxy-5- α -pregnane-20-one in rats. *Neuropharmacology* 48, 627e 638.

KALUEFF, A. V. & TUOHIMAA, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13, 151-158.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods* 143, 169–177.

KOMOROWSKA, P.; PISULA, W. (2003). Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behaviour in rats? *Int J Comp Psychol*; 16: 237–46.

KUDRYAVTSEVA, N. N.; BONDAR, N. P. (2002). Anxiolytic and Anxiogenic Effects of Diazepam in Male Mice with Different Experience of Aggression. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, No. 4, PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY.*

LISTER, R. G. (1990). Ethologically-Based Animal Models of Anxiety Disorders. *Pharmacology & therapeutics*, Pergamon Press, vol. 46, pp 321-340.

LISTER, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185.

NIN, M. S; PEREIRA, N. S. C; SOUZA, M. F; AZEREDO, L. A; FERRI, M. K; DALPRÁ, W. L; GOMEZ, R; BARROS, H. M. T. (2012). Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests. *European Journal of Pharmacology* 684, 95–101.

PELLOW, S; FILE, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 525-529.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. (1993). Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*, 113: 237-242.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. (1994). *Ethology and Psychopharmacology*. S. J. Cooper and C.A. Hendrie Editora.

SANTIAGO, J. C. (2006). Ansiedade: Tratamento da ansiedade. Abordagens para a sua saúde e bem estar. Disponível em: <<http://www.jcsantiago.info/ansiedade.html>>. Acesso: 20 set. 2010.

SPASOJEVIĆ, N.; GAVRILOVIĆ, L.; VARAGIĆ, V. V.; DRONJAK, S. (2007). Effects of chronic diazepam treatments on behavior on individually housed rats. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 59 (2), 113-117.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44: 463-469.

VAN ERP, A. M.; KRUK, M. R.; MEELIS, W.; WILLEKENS-BRAMER, D. C. (1994). Effect of environmental stressors on time course variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research* 65, 47-55.

VAN, E. R. P. A. M.; KRUK, M. R.; WILLEKENS-BRAMER, D. C.; FERMONT, P. C.; NIJSEN, M. J. (1995). PVH lesions do not inhibit stressor-induced grooming in the rat. *Physiol Behav*; 57:887-92.

WILLNER, P. (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychia*; 10: 677-690.