MAYRON PEREIRA PICOLO RIBEIRO

EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE O *GROOMING* INDUZIDO POR CONTENÇÃO EM RATOS

Londrina
2016

MAYRON PEREIRA PICOLO RIBEIRO

EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE O *GROOMING* INDUZIDO POR CONTENÇÃO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, da Universidade estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Célio Estanislau

Londrina
2016

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

Ribeiro, Mayron Pereira Picolo.
Efeito do diazepan sobre o grooming induzido por contenção em ratos / Mayron Pereira Picolo Ribeiro. - Londrina, 2016.
30 f.

Orientador: Célio Estanislau.
Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Grooming - Tese. 2. Diazepan - Tese. 3. Estresse - Tese. 4. Contenção - Tese. I. Estanislau, Célio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. III. Título.

MAYRON PEREIRA PICOLO RIBEIRO

EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE O *GROOMING* INDUZIDO POR CONTENÇÃO EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, da Universidade estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

_____

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

_____

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

_____

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

Londrina, 22 de Agosto de 2016

Dedico este trabalho ao meu avô, João Evangelista, “the fixer” (*in memoriam*), responsável pelo homem que sou.

AGRADECIMENTOS

In every victory, let it be said of me: “my source of strength, my source of hope is Christ alone”[1]. Assim, agradeço Àquele que cuidou de mim e guiou meus passos para que esse momento se tornasse real na minha vida. Ao Eterno, que me faz forte e me capacita.

Agradeço aos meus pais, Ivanilde e Itamar, minhas avós, Cida e Hilda, minha irmã, Nayara, e a toda a minha família pelo constante apoio. Se cheguei até aqui foi pelo suporte e educação que vocês me proporcionaram, além de todas as condições emocionais e financeiras para que isso acontecesse.

Agradeço ao Dr. Célio Estanislau, meu orientador, com quem tive o privilégio de trabalhar nos últimos anos e que foi responsável por criar condições para que eu saísse daqui como um pesquisador (ainda que com muito a aprender). Obrigado por tudo! E espero que trabalhemos muito juntos.

Agradeço, também, aos colegas de laboratório pelas assistências com os experimentos e auxílios ao longo de toda minha pesquisa. Em especial, agradeço ao Guilherme Bacarense pela apoio e orientação com estatística.

Aos colegas que fizeram dessa uma das melhores experiências da minha vida, meu muito obrigado. Principalmente àqueles que se tornaram amigos e me ensinaram que é sim possível diversão em plena pós-graduação. Vocês, Gabi, Karina, Laís, Luciano, Ludmila e Marcela representam algumas das grandes conquistas minhas nesse mestrado.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio e motivação, principalmente os melhores: Paulo Victor, Gustavo, Júnior, Allan, Daniel e Lucas. Irmão, mesmo você tendo me apresentado *Prison Break* durante a análise dos vídeos e eu assistindo a série completa, deu certo!

Minha gratidão ao Dr. Amauri Gouveia (UFPA) pela prontidão em sentar comigo em uma mureta na UFMG, ver meus resultados e me oferecer possibilidades de interpretação dos meus dados.

[1] Que em cada vitória que eu tiver, ouçam de mim: “minha fonte de força, minha fonte de esperança é somente Cristo”.

RIBEIRO, Mayron Pereira Picolo **Efeito do diazepam sobre o *grooming* induzido por contenção em ratos.** 2016. 30 f. Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

Um importante recurso para o estudo da ansiedade é o uso de modelos animais, pois permitem investigações de situações e de comportamentos relacionados à ansiedade que seriam inviáveis em estudos com humanos. Nesse sentido, o comportamento de grooming tem sido estudado em roedores quanto à sua relação com o estresse. Embora haja evidências dessa relação, estudos recentes têm relacionado o *grooming* com momentos de desexcitação e não necessariamente de estresse. O objetivo do presente estudo foi investigar como a resposta de *grooming* induzido por contenção pode ser modulada por diferentes doses de diazepam, um ansiolítico benzodiazepínico. Cinco grupos de 12 ratos foram tratados com doses de 1 mg/Kg (DZP1), 2 mg/Kg (DZP2), 3 mg/Kg (DZP3), 4 mg/Kg (DZP4) de Diazepam ou apenas com salina (veículo). Os animais foram individualmente submetidos a um período de contenção: dentro de um cone de arame por 30 minutos, posicionados de forma a evitar que o animal se sujasse em sua própria urina e/ou fezes. Outros cinco grupos foram igualmente tratados com as doses mencionadas acima, porém não submetidos ao procedimento de contenção. A seguir, todos os sujeitos tiveram o seu comportamento filmado em uma caixa de acrílico por 20 minutos. O *grooming* foi observado quanto à duração total, a duração dos componentes rostral e corporal e a quantidade de cadeias estereotipadas. A frequência de comportamentos exploratórios foi medida por meio dos comportamentos de levantar (*rearing*) e locomoção na caixa acrílica. O grupo submetido à contenção e tratado com a dose de 4 mg/Kg mostrou taxas menores de locomoção e de levantar. Os sujeitos submetidos ao procedimento de estresse emitiram mais comportamento de *grooming* do que os do grupo controle e apenas a maior dose mostrou-se eficaz em reverter esse efeito. O registro com distinção entre *grooming* rostral e corporal mostrou que o efeito se deveu a alteração nesse último apenas. A frequência de cadeias estereotipadas de *grooming* acompanhou de forma aproximadamente proporcional a duração do *grooming* corporal. Nosso estudo indica que ratos estressados gastam mais tempo com os componentes corporais do *grooming* e, em combinação com resultados obtidos em pesquisas prévias, aponta para a especificidade desse componente do *grooming* quanto à desexcitação. Assim, pode-se afirmar que o estresse por contenção potencializa o efeito do diazepam sobre os comportamentos estudados.

Palavras-chave: *Grooming*. Estresse. Contenção. Cadeia estereotipada. Diazepam. Benzodiazepínico.

RIBEIRO, Mayron Pereira Picolo. **The effect of the diazepam on restraint-induced grooming**. 2016. 30 p. Dissertation (Master Degree in Behavior Analysis) - Universidade Estadual de Londrina, Londrinda.

ABSTRACT

The use of animal models is an important resource for studying anxiety-related behaviors since it allows the investigation of situations and behaviors that would be unviable for studies with humans. For such, animal behavior has been widely studied in order to obtain trustable indexes of grooming and its relation to stress. Even though there are evidences of this relation, recent studies have related grooming with a moment of dearousal, and not necessarily stress. The objective of this study was to investigate how the restraint-induced grooming may be modulated by different doses of diazepam, a benzodiazepine anxiolytic. Five groups of 12 rats were injected with 1 mg/Kg (DZP1), 2 mg/Kg (DZP2), 3 mg/Kg (DZP3), 4 mg/Kg (DZP4) of diazepam or saline solution (vehicle). The animals were individually restrained for a 30-minute period in a wire mesh, arranged in a way to avoid the animal's getting dirty on its urine and feces. The same amount was equally treated with the above mentioned injections but no restraint. After the procedure, they had their behavior filmed for 20 minutes in an acrylic box. Grooming was observed as to its total, body and rostral duration and the frequency of stereotyped chains. The frequency of the exploratory behaviors was measured by analyzing the animals' rearing and crossings in the acrylic box. The restrained group treated with 4 mg/Kg of diazepam showed lower rates of rearing and crossings. The restrained subjects spent more time grooming than the control group and only the highest dose was able to revert this effect. The distinct data obtained by separately registering rostral and body grooming showed that this effect was due to the latter. The frequency of the stereotyped chains of grooming approximately followed the body grooming duration. Our study indicates that stressed animals spend more time with the body component of grooming and, in combination with results obtained in previous researches, points to the specificity of this component as related to dearousal. Thus, it can be said that restraint-induced stress potentiates the effects of the diazepam over the target behaviors.

Keywords: Grooming. Stress. Restraint. Stereotyped chains. Diazepam. Benzodiazepine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Frequência de cruzamentos em uma caixa de acrílico de ratos submetidos a contenção e tratados com diazepam 20

Figura 2 – Frequência de elevações em uma caixa de acrílico de ratos submetidos a contenção e tratados com diazepam ..... .21

Figura 3 – Tempo em segundos de grooming de ratos submetidos à contenção e tratados com diazepam em uma caixa de acrílico ..... .22

Figura 4 – Tempo em segundos de grooming corporal de ratos submetidos à contenção e tratados com diazepam em uma caixa de acrílico ..... .23

Figura 5 – Frequência de cadeias estereotipadas de ratos submetidos à contenção e tratados com diazepam em uma caixa de acrílico ..... .24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
APA	*American Psychological Association*
CNT	Contenção
CRH	Hormônio Liberador da Corticotrofina
CTL	Controle
DSM-IV-TR	Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais – 4ª Edição – Texto Revisto
DZP	Diazepam
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 10

MÉTODO 17
Sujeitos 17
Equipamentos 17
Procedimento 17
Droga 19
Análise de dados 19

RESULTADOS 20

DISCUSSÃO 24

REFERÊNCIAS 28

Introdução

O estresse é um tema recorrente no meio científico. A *American Psychological Association* (APA) questiona se viver sob estresse (ou estressado) seria o novo padrão de vida da maioria dos indivíduos. Em uma pesquisa realizada pela mesma instituição, 72% dos respondentes afirmaram que o seu nível de estresse aumentou ou permaneceu no constante nos cinco anos anteriores à pesquisa e mais de 53% dos 2020 entrevistados afirmaram buscar métodos para reduzir seu grau de estresse. Apesar de relatarem aumento do estresse, o nível geral apresenta um declínio nos últimos anos. Contudo, o índice de ocorrência ainda é alto, já que adultos afirmam um nível de estresse de 4.9 em uma escala onde 10 é o nível máximo (American Psychological Association, 2013).

O estresse foi primeiramente definido como uma síndrome produzida por diversos agentes nocivos, que representaria um esforço generalizado do corpo humano para manter a homeostase quando exposto a diferentes estressores, tais como exposição ao frio, ferimentos cirúrgicos, choques, exercícios físicos exagerados, intoxicações com drogas etc. (Selye, 1936; 1973). A exposição contínua a eventos estressores, chamada por Selye (1936; 1973) de Síndrome de Adaptação Geral, consistiria na detecção do agente estressor (reação de alarme); na reação ao agente estressor (resistência); e o fim da resposta ao estresse (exaustão). Recentes pesquisas têm apontado outros eventos como estressores. Acontecimentos vitais dependentes (aqueles que ocorrem pela escolha do indivíduo) e independentes (aqueles além do controle do sujeito) e até situações diárias tais como não encontrar coisas que procura, esperar em diversos contextos e viver relacionamentos perturbados podem ser ocasião para que a resposta de estresse ocorra (Margis, Picon, Cosner, & Silveira, 2003).

Miller e Smith (1994) categorizaram o estresse em três diferentes tipos: estresse agudo, estresse agudo episódico e estresse crônico. O estresse agudo, segundo os autores, seria a forma mais comum de estresse e viria a partir de exigências e pressões ou da história recente

ou antecipação de eventos futuros pelo sujeito. Essa forma de estresse é de curta duração e não causa os mesmos danos de uma síndrome de longa duração, mas pode causar raiva e irritabilidade, ansiedade e depressão, além de problemas musculares e gastrointestinais. A segunda forma de estresse, agudo episódico, é semelhante à primeira, mas ocorre de forma frequente, podendo os sintomas ser mais duradouros. Essa segunda forma pode até mesmo ser causadora de doenças cardíacas, requerendo, portanto, a intervenção de profissionais. O último tipo, o crônico, tem sido relacionado a diversas morbidades: suicídio, violência, ataque cardíaco, acidente vascular cerebral e até mesmo câncer. Esse tipo de estresse pode vir atrelado a experiências contínuas de demandas e pressões ou a experiências consideradas traumáticas.

O corpo humano responde ao estresse ativando um repertório psicológico e comportamental complexo, envolvendo respostas adaptativas do SNC e periférico. A percepção do agente estressor ativa o hipotálamo, promovendo a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que através do sistema porta-hipofisário, provoca a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adenoipófise. Ao mesmo tempo, a porção medular das adrenais (estimulada via sistema nervoso autônomo) libera adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea, regulando os sistemas cardiovascular, respiratório, renal, gastrointestinal, endócrino entre outros. A ação do ACTH promove a liberação do cortisol pelo córtex das adrenais e da corticosterona em animais. Esses hormônios são responsáveis por disponibilizar grande quantidade de glicose na corrente sanguínea, possibilitando substrato energético para respostas de luta ou fuga (Charmandari, Tsigos, & Chrousos, 2005).

Efeitos encefálicos duradouros foram observados em sujeitos experimentais submetidos a situações de estresse, principalmente em um SNC em desenvolvimento (no caso de indivíduos mais jovens) e relacionadas a mudanças causadas pela idade, o que pode ser um fator determinante para o surgimento e manutenção de transtornos depressivos ou até de

estresse pós-traumático (Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009), além dos transtornos de apego reativo, de interação social desinibida, de estresse agudo e de adaptação (American Psychiatric Association, 2014). O DSM-IV-TR (2000) também aponta para essa relação ao afirmar que os indivíduos que apresentam transtornos de ansiedade têm os sintomas frequentemente piorados em tempos de estresse. O DSM V (2014) afirma que o estresse causado pelo ambiente pode desencadear comportamentos estereotipados. Outra resposta que está comumente associada ao estresse é a ansiedade. Ratos expostos a estressores apresentaram um aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em diversos testes (Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, & Spear, 2009).

Margis et al. (2003) pontuam que a relação entre ansiedade e estresse, embora plausível, tem sido pouco estudada. Para os autores, os sintomas de ansiedade podem surgir como resposta a eventos estressores, que estariam relacionados a comportamentos em três diferentes níveis: 1) cognitivo, ao alterar a forma como o indivíduo percebe determinada situação; 2) comportamental, com respostas de fuga, luta e/ou colapso e; 3) neuroanatômico, com atividade de partes encefálicas envolvidas em respostas de estresse, tais como a amígdala e o sistema septo-hipocampal.

O envolvimento de neurotransmissores relacionados à ansiedade e estresse também tem sido investigado. Após o "desequilíbrio" causado pelo contato com o estressor, neurotransmissores inibitórios são liberados na tentativa de manter a homeostase. O principal desses no SNC é o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Margis et al., 2003). Existem várias formas de regulação dessa resposta, e uma delas é a farmacológica. Benzodiazepínicos são drogas hipnóticas e ansiolíticas de ação direta no SNC, modulando os sistemas inibitórios de neurotransmissão GABAérgica. Alguns ansiolíticos atuam como agonistas benzodiazepínicos, intensificando a ação do GABA, dessa forma, facilitando a abertura dos canais de cloreto e hiperpolarizando as células onde atuam. Receptores de benzodiazepínicos e GABA estão

amplamente distribuídos ao longo do SNC, sendo responsáveis por respostas de regulação à ansiedade. Um deles é o diazepam –ansiolítico amplamente utilizado para tratamento de ansiedade e transtornos a ela relacionados (Silva, 2013). O efeito ansiolítico do diazepam pode inclusive ser demonstrado em animais (ver, por exemplo, o efeito em ratos testados no labirinto em cruz elevado em Cole e Rodgers, 1995).

Diferentes métodos têm sido utilizados como estressores em pesquisas com animais. Buynitsky e Mostofsky (2009) realizaram uma vasta pesquisa, apontando diferentes procedimentos, frequências, intensidades e durações de contenção e/ou outras formas de estressores. Um dos procedimentos preferenciais para estresse em ratos, de acordo com os autores, é a utilização de aparatos (redes de arame) para a contenção física dos animais. Isso porque é um procedimento de baixo custo, direto, não envolve dano físico ao sujeito de forma a impedir ou alterar seus movimentos e é indolor. Esse tipo de procedimento poderia simular situações de captura por predadores, o que representaria perigo para o animal, eliciando respostas relacionadas ao estresse e ansiedade. Com relação à duração do procedimento, os autores apontam que um período de 30 minutos de contenção se mostrou eficaz enquanto estressor por apresentar um aumento no nível de corticosterona, além de ampliar as respostas relacionadas à ansiedade.

Um dos comportamentos estudados através de modelos-animais visando compreender melhor a relação estresse-ansiedade é o *grooming*. O *grooming* é um comportamento inato nos animais descrito comumente como autolimpeza, podendo se apresentar em ratos como uma sequência de ação natural que ocorre de maneira espontânea ou como uma resposta a estímulos biológicos significantes (Berridge, Fentress, & Parr, 1987). É uma classe de comportamentos que, no caso dos ratos, envolve diferentes funções: 1) a reorganização de pelos; 2) a remoção de objetos estranhos ao corpo tais como poeira, sujeira, gordura ou parasitas; 3) aplicação de substâncias e 4) estimulação sensorial (Spruijt, Van Hooff, &

Gispen, 1992). Sua principal finalidade etológica é o cuidado com a superfície corporal. Além de atuar para os fins acima mencionados, tem papel fundamental na regulação térmica de roedores. Sprujit et al. (1992) afirmam que, por possuírem propriedades bactericidas em sua saliva, o comportamento de *grooming* em roedores auxiliaria o processo de cura de feridas. Esse comportamento é altamente sensível a manipulações genéticas, ambientais e farmacológicas e sua análise tem sido utilizada em pesquisas, apontando semelhança com os comportamentos de autolimpeza dos seres humanos (Kalueff et al., 2016).

O *grooming* tem sido observado em diversos contextos, podendo suceder o contato social bem como comportamento sexual e exploratório e, ainda, preceder o dormir. Eventos estressores, assim como ambientes/situações de novidade, poderiam, também, ser ocasião para a ocorrência desse comportamento. Respostas de *grooming* corporal apresentaram-se em uma taxa mais elevada em ambientes novos quando comparada a ambientes familiares (gaiola) (Sprujit et al., 1992; Katz & Roth, 1979; Jolles, Rompa-Barendregt, & Gispen, 1979; Van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994). O estudo desse comportamento pode ser útil por se relacionar com transtornos humanos nos quais o *grooming* é um sintoma. Isso não significa que ele esteja relacionado a um tipo específico de transtorno, mas sim que representa "um modelo de comportamentos sequencialmente estereotipados, repetitivos e auto direcionados" (Kalueff et al., 2016, p. 45), relacionados a determinados transtornos mentais.

Kalueff et al. (2016) apontam que uma das características do *grooming* é seu alto padrão estereotipado de movimentos sequenciais. O principal desses padrões de movimentos é conhecido por cadeias sintáticas estereotipadas. Berridge, Aldridge, Houchard e Zhuang (2005) apresentam uma cadeia estereotipada como uma série de até 25 movimentos, combinados em quatro fases sintáticas, contendo repetições de cada componente particular. A primeira fase consiste em 5-10 movimentos elípticos das patas dianteiras simultaneamente sobre o focinho e as vibrissas. Na segunda fase, podem ser apresentados de um a quatro

movimentos assimétricos ou unilaterais feitos com as patas dianteiras em movimentos alternados um pouco mais amplos que os da primeira fase. A terceira fase consiste em movimentos distintos dos primeiros por serem altamente simétricos entre as duas patas dianteiras na região do focinho, passando pelos dois lados da face até atingir a parte superior das orelhas. Os movimentos dessa fase são altamente estereotipados e acontecem em velocidade inferior à da fase anterior. A última fase conclui a cadeia estereotipada. O rato tipicamente se volta para a lateral do corpo, direcionando as lambidas para o flanco em direção caudal. Kalueff et al. (2016) afirmam que esse comportamento pode ter relação com os comportamentos humanos com características similares de estereotipia, tais como comportamentos sexuais e agressivos que, uma vez iniciados, tendem à completude sem a necessidade de *feedback* sensorial. O *grooming*, inclusive, mostrou-se experimentalmente manipulável, já que lesões, mutações genéticas e o estresse psicológico afetaram sua ocorrência. Ratos submetidos a estresse por contenção emitiram elevada frequência de cadeias estereotipadas, o que poderia indicar que esse tipo de comportamento está associado à recuperação de altos níveis de excitação (Veloso, Filgueiras, Lorenzo, & Estanislau, 2016). Berridge *et al.* (2005) observaram que camundongos emitiram maior frequência de cadeias estereotipadas no laboratório (ambiente novo) quando comparadas à frequência emitida nas gaiolas-viveiro, sugerindo que um maior número de cadeias estereotipadas indicaria contato com um contexto aversivo.

Para possibilitar uma análise mais acurada, além das cadeias estereotipadas, o *grooming* tem sido dividido em dois componentes: rostral e corporal. Estanislau *et al.* (2013), baseando-se em comparações entre linhagens de ratos que foram selecionadas para desempenhos opostos em uma tarefa de esquiva ativa, afirmam que esses diferentes componentes podem ser modulados separadamente. Para os autores, enquanto o *grooming* corporal aumenta quando o animal é exposto à novidade proporcionalmente ao nível de ansiedade.

Enquanto algumas pesquisas apontam para o *grooming* como um indicador de ansiedade/estresse, outros estudos têm mostrado que esse comportamento pode estar mais relacionado com o momento subsequente ao estresse, que seria o de desexcitação, trazidos na literatura como *dearousal* (Nosek, et al., 2008; Estanislau, 2012; Veloso, et al., 2016). Albonetti & Farabollini (1992) mostraram que o tempo total de *grooming* de um grupo de ratos aumentou após a aplicação de contenção. Klein, Padow, & Romeo (2009) afirmam, por outro lado, que o estresse causado por contenção não teria alterado consideravelmente respostas de *grooming*, alterando, apenas respostas de cunho social. Reimer et al. (2015) submeteram ratos a testes envolvendo estresse e observaram que, embora outras respostas relacionadas à ansiedade variassem de acordo com o teste, o *grooming* parecia manter-se estável. Uma das limitações encontradas nesse tipo de estudo é a duração dos testes. Nesse último estudo, apesar de terem sido observados dez minutos de comportamento, apenas os últimos cinco foram considerados para análise e o *grooming* foi avaliado apenas com relação à duração total. Resultados discrepantes têm sido relatados, possivelmente devido à curta duração das sessões utilizadas em diferentes testes, mascarando os efeitos tardios vistos no *grooming* (Estanislau et al., 2013). Ratos colocados no labirinto em cruz elevado, por exemplo, gastaram mais tempo no *grooming* rostral quando comparado ao corporal nos primeiros cinco minutos da sessão, contudo, ao analisar a sessão completa, o componente corporal durou mais do que o rostral (Veloso et al., 2016). A maior dedicação ao corporal em momentos subsequentes da sessão poderia refletir um processo de desexcitação. Estanislau (2012) menciona que se testes mais prolongados fossem realizados, uma investigação mais detalhada da relação entre *grooming* e ansiedade poderia ser realizada.

Assim, por meio da atual pesquisa, objetivou-se investigar a resposta de *grooming* como um indicador de ansiedade em resposta à novidade e ao estresse, testando diferentes doses de diazepam para analisar de que forma o ansiolítico modula tal resposta.

Método

Sujeitos

Foram utilizados 120 ratos machos da linhagem Wistar (250-350 g), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, experimentalmente inexperientes. Eles foram alojados em número de quatro por gaiola, mantidos sob temperatura média de 24ºC ±1ºC e um ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7h00 e apagadas às 19h00), com acesso a água e ração industrial *ad libitum*. O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Londrina entre as 14h00 e 18h00. Os procedimentos foram realizados conforme as orientações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (proc. 32819.2013.61).

Equipamentos

Foram usadas gaiolas de polipropileno (28 cm x 17 cm x 13 cm) para alojamento dos sujeitos. Para a contenção, foram utilizadas malhas de arame preparadas de forma a evitar que o animal se sujasse nas suas fezes e urina, suspensos a uma distância de 0,3 m do chão. Todas as sessões foram filmadas e uma caixa de acrílico (30 cm x 30 cm x 60 cm) foi utilizada para a observação do comportamento do animal após a contenção. A caixa de acrílico foi escolhida por facilitar o registro dos comportamentos do rato. Espelhos inclinados foram colocados na parte inferior da caixa permitindo a observação de qualquer comportamento que o rato fizesse, inclusive quando ele estivesse de costas para a filmadora.

Procedimento

Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupo controle e grupo experimental, com ou sem contenção, com quatro doses diferentes de diazepam ou apenas salina, conforme mostra a Tabela 1. Os sujeitos foram submetidos a apenas uma sessão.

No início da sessão, os sujeitos pertencentes ao grupo de contenção (CNT) eram confinados a uma malha de arame, cuja finalidade foi a sua contenção por um período de 30 minutos de forma a limitar as possibilidades de movimentação. No início desse período, uma injeção (conforme Tabela 1) foi administrada via intraperitoneal. Os sujeitos foram, então, suspensos em uma sala separada. Após a contenção, os animais foram removidos e colocados na caixa acrílica e foram filmados por 20 minutos. Os animais do grupo controle não foram submetidos ao procedimento de contenção. Após a administração do tratamento apropriado, os sujeitos foram devolvidos à sua gaiola-viveiro, onde permaneceram por 30 minutos até que fossem levados à caixa de acrílico para serem filmados por 20 minutos. Dois sujeitos foram submetidos à contenção ao mesmo tempo e testados em caixas de acrílico diferentes e visualmente isoladas.

As categorias comportamentais mensuradas foram: 1) *Grooming*: quanto à sua frequência e tempo. Dois componentes foram discernidos: rostral e corporal; 1.1 *Grooming* rostral: movimentos de fricção com as patas dianteiras (incluindo lambidas nessas patas) em direção ao nariz, focinho, cabeça e orelhas; 1.2 *Grooming* corporal: limpeza dos pelos ou pele corporais, incluindo as partes laterais e ventrais do tronco, área genital e cauda. As coçadas no corpo (seguidas de lambidas) com as patas traseiras (*scratching*) também foram consideradas pertencentes a essa categoria. Quando o animal suspendia qualquer uma dessas ações de *grooming* (i.e., períodos de não-*grooming*), foi considerado como uma interrupção apenas se o animal retomasse a limpeza em até cinco segundos. O tempo total de *grooming* foi obtido pela soma do tempo de todos os episódios. Uma cadeia estereotipada era registrada sempre que fricções de 6-7 Hz de pata dianteira com a região oral eram seguidas por uma série curta de movimentos mais lentos dirigidos à cabeça e, então, por *grooming* corporal (para descrições detalhadas de cadeias estereotipadas (ver Berridge et al., 1987 e Berridge *et al*., 2005). E 2) outras categorias de comportamentos exploratórios, tais como: 2.1 Cruzamentos

entre quadrantes na caixa acrílica e; 2.2 Elevações.

Droga

A droga utilizada foi o diazepam Roche. A substância foi diluída em uma solução de salina imediatamente antes da sua utilização no experimento.

Tabela 1

Administração do tratamento de acordo com o grupo a ser testado.

Grupo	Controle N. de Sujeitos	Contenção N. de Sujeitos	Injeção
Salina	12	12	Veículo (10ml/Kg salina)
DZP1	12	12	1mg/Kg Diazepam
DZP2	12	12	2mg/Kg Diazepam
DZP3	12	12	3mg/Kg Diazepam
DZP4	12	12	4mg/Kg Diazepam

Análise de Dados

Os dados foram analisados quanto à duração (*grooming* total, *grooming* rostral e corporal) e frequência de ocorrência (locomoção, elevação e cadeias estereotipadas). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade, e foram submetidos à ANOVA de duas vias (tratamento e contenção), seguido do teste *post hoc* Fisher LSD.

Resultados

A Figura 1 mostra os resultados da locomoção. De acordo com a ANOVA de duas vias, não houve efeito da contenção ($F_{[1,102]} = 0,80$; $p > 0,05$), mas sim da dose de diazepam ($F_{[4,102]} = 3,70$; $p < 0,01$) e uma interação entre a contenção e a dose ($F_{[4,102]} = 2,80$; $p < 0,05$). Com efeito, o grupo submetido à contenção e tratado com 4 mg/Kg de diazepam se deslocou menos que os demais submetidos à contenção. Esse grupo também se deslocou menos que o grupo tratado com a mesma dose, mas não submetido à contenção.

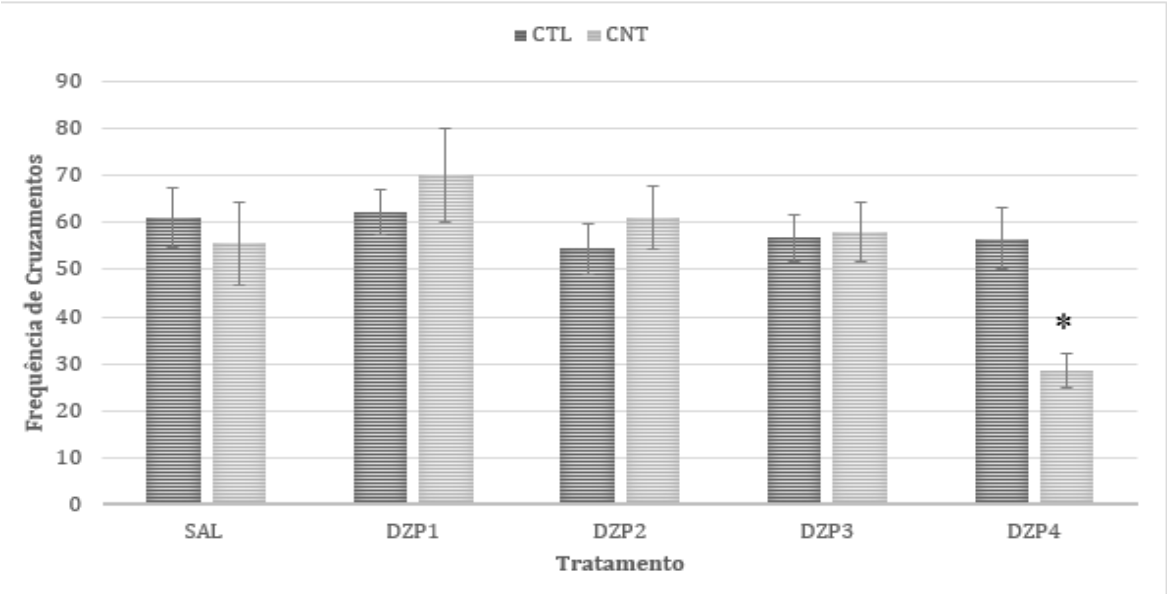

Figura 1. Frequência de cruzamentos entre quatro quadrantes em uma caixa de acrílico de ratos previamente submetidos a contenção (CNT) e seus respectivos controles (CTL) tratados com diazepam * $p < 0,01$ em comparação ao grupo salina correspondente; º $p < 0,01$ em comparação aos animais controles tratados com a mesma dose

Observou-se efeito (Figura 2) da contenção ($F_{[1,102]} = 5,81$; $p < 0,05$) e do tratamento ($F_{[1,102]} = 6,23$; $p < 0,001$) no comportamento de elevação (*rearing*), mas não na interação entre os dois ($F_{[1,102]} = 1,32$; $p > 0,05$), segundo revelou a ANOVA. A dose mais alta de diazepam (4 mg/Kg) reduziu o comportamento de elevação tanto no grupo controle como no estressado. Os ratos não submetidos à contenção e tratados com 4 mg/Kg de diazepam

apresentaram menor ocorrência desse comportamento quando comparados àqueles tratados com salina e igualmente não submetidos à contenção ($p < 0,05$). Os sujeitos tratados com a mesma dose e submetidos à contenção também apresentaram menor frequência de elevações do que os injetados com salina e igualmente submetidos à contenção ($p < 0,001$). A dose de 4 mg/Kg de diazepam ainda se mostrou eficaz em reduzir o comportamento de elevação dos sujeitos estressados quando comparado aos não-estressados ($p < 0,01$).

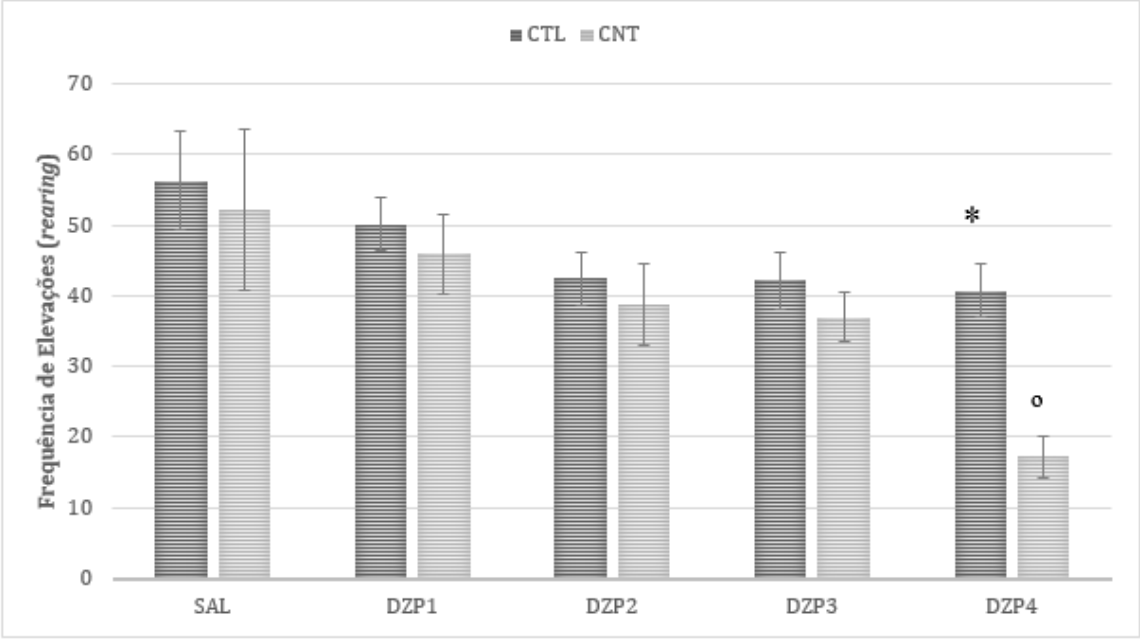

Figura 2. Frequência de elevações em uma caixa de acrílico de ratos previamente submetidos a contenção (CNT) e seus respectivos controles (CTL) tratados com diazepam. * $p < 0,05$, comparado ao salina correspondente. º $p < 0,01$, comparado ao controle tratado com a mesma dose

O tempo total gasto com *grooming* pode ser encontrado na Figura 3. A ANOVA mostrou efeito da contenção ($F_{[1,102]} = 27,15$; $p < 0,001$) e do tratamento ($F_{[4,102]} = 3,93$; $p < 0,01$), mas não interação entre contenção e droga ($F_{[4,102]} = 2,40$; $p > 0,05$). Os animais submetidos à contenção emitiram mais comportamento de *grooming* do que os que não receberam. Isso pôde ser observado principalmente nos sujeitos tratados com salina ($p <$

0,01), 2 mg/Kg ($p < 0,001$) e 3 mg/Kg ($P < 0,01$) de diazepam. Apenas a dose de 4 mg/Kg mostrou-se eficaz em reduzir a duração do *grooming* corporal quando comparado ao grupo controle (tratado com salina), submetido à contenção ($p < 0,001$).

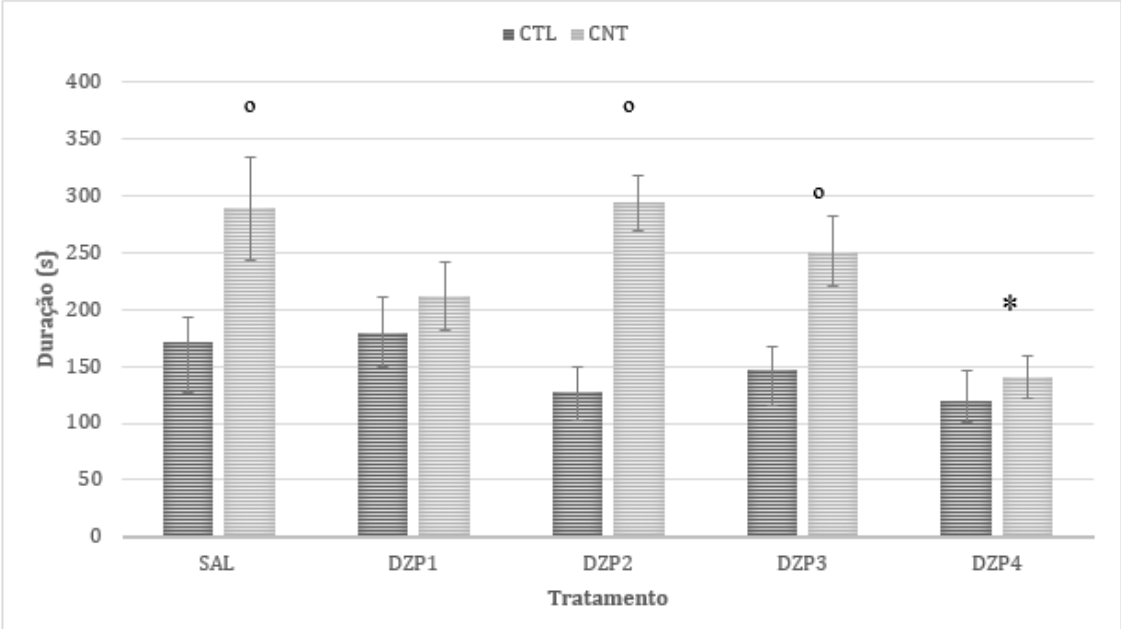

Figura 3. Tempo em segundos de grooming em uma caixa de acrílico de ratos previamente submetidos a contenção (CNT) e seus respectivos controles (CTL) tratados com diazepam. * $p < 0,05$ comparado ao salina correspondente; º $p < 0,05$ comparado ao controle correspondente.

Na Figura 4, pode-se observar o tempo gasto com *grooming* corporal. O efeito da contenção ($F_{[1,102]} = 43,06$; $p < 0,0001$), efeito do tratamento ($F_{[1,102]} = 5,21$; $p < 0,001$) e da interação entre tratamento e contenção ($F_{[1,102]} = 3,08$; $p < 0,05$) foi evidenciado pela ANOVA de duas vias. Os ratos submetidos à contenção e tratados com salina dedicaram mais tempo ao componente corporal do *grooming* do que os do grupo controle ($p < 0,001$). Nos ratos estressados, apenas a dose de 4 mg/Kg de diazepam ($p < 0,001$) mostrou-se eficaz em reduzir o tempo de *grooming* corporal, enquanto nos não-estressados, nenhuma dose reduziu significantemente a ocorrência desse comportamento. Ao se comparar as doses testadas com e sem o pré-tratamento (contenção), as doses de 1 mg/Kg ($p < 0,05$), 2 mg/Kg ($p < 0,001$) e 3

mg/Kg ($p < 0,01$) mostraram resultados significativos: a duração do *grooming* corporal foi superior, novamente, nos grupos estressados. Não foram encontrados dados significativos com relação à duração do *grooming* rostral.

Diferenças significativas foram encontradas na quantidade de cadeias (*chains*) emitidas pelos sujeitos. A Figura 5 mostra os resultados obtidos para essa classe de respostas. A ANOVA de duas vias mostrou efeito da contenção ($F_{[1,102]} = 20,17$; $p < 0,001$) e da droga utilizada ($F_{[4,102]} = 1,33$; $p < 0,001$). Na interação entre contenção e droga, nenhum dado significativo foi encontrado nesse quesito. Como pode ser observado, os ratos estressados emitiram significativamente mais cadeias estereotipadas ao longo do experimento. A quantidade de cadeias observada no grupo submetido à contenção e tratado com salina foi superior à dos grupos igualmente submetidos à contenção, mas tratados com 1 mg/Kg ($p < 0,05$), 3 mg/Kg ($p < 0,05$) e 4 mg/Kg ($p < 0,001$) de diazepam. O mesmo grupo apresentou maior quantidade de cadeias do que os ratos também tratados com salina, mas não submetidos à contenção ($p < 0,01$).

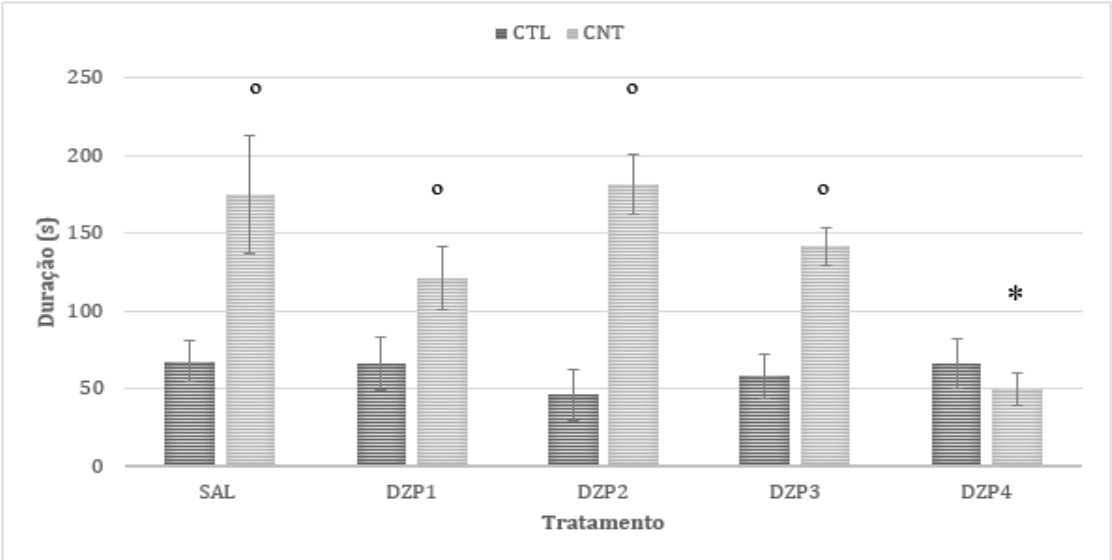

Figura 4. Tempo em segundos de grooming corporal em uma caixa de acrílico de ratos previamente submetidos a contenção (CNT) e seus respectivos controles (CTL) tratados com diazepam. * $p < 0,05$ comparado ao salina correspondente; º $p < 0,05$ comparado ao controle correspondente

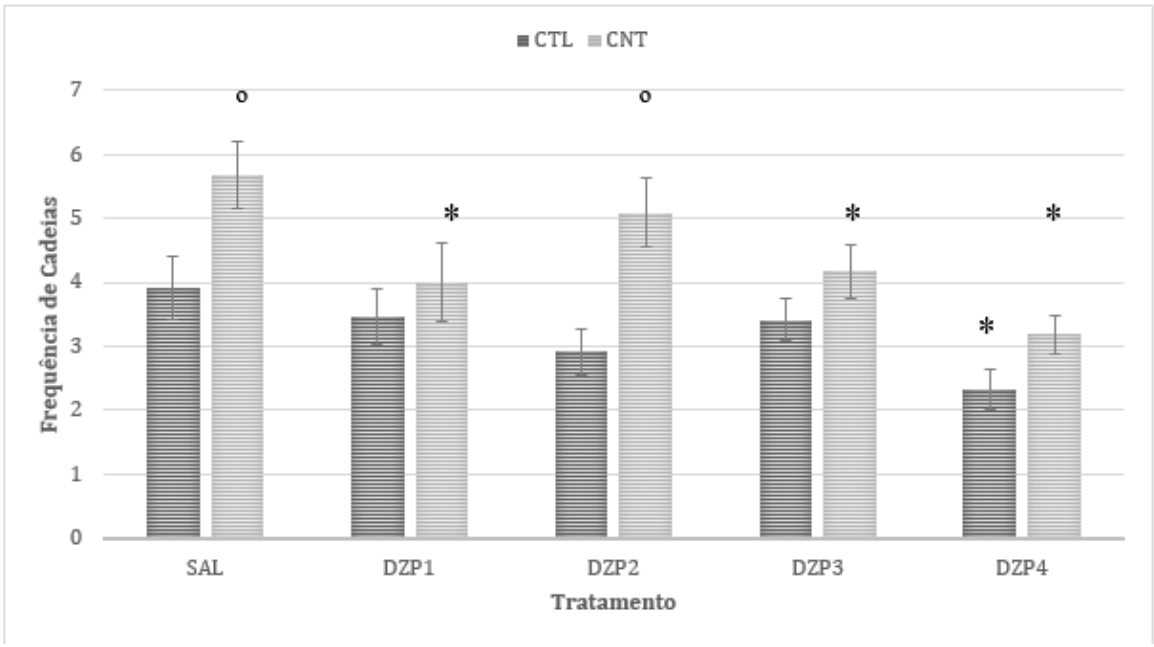

Figura 5. Frequência de cadeias estereotipadas em uma caixa de acrílico de ratos previamente submetidos a contenção (CNT) e seus respectivos controles (CTL) tratados com diazepam. * $p < 0,05$ comparado ao salina correspondente; º $p < 0,05$ comparado ao controle correspondente

Discussão

O objetivo deste estudo foi examinar o *grooming* como um indicador de ansiedade após um procedimento de contenção, testando diferentes doses de diazepam a fim de investigar como o ansiolítico controla a emissão desse comportamento. Confirmando dados previamente obtidos, o comportamento de *grooming* mostrou-se sensível a experiências estressantes. Os sujeitos submetidos à contenção, um procedimento estressante para ratos (Buynitsky & Mostofsky, 2009), dedicaram mais tempo ao *grooming* do que o grupo controle. Esse tempo se deve, principalmente, ao tempo gasto com o componente corporal do *grooming*, já que os níveis de rostral se mantiveram equivalentes em todos os grupos experimentados.

A contenção teve efeito no comportamento exploratório apenas na dose mais alta. A locomoção ficou alterada apenas nos sujeitos tratados com 4 mg/Kg de diazepam e

submetidos à contenção, mostrando que a contenção potencializou o efeito da droga. Os sujeitos tratados com a mesma dose mas não submetidos à contenção mostraram a mesma frequência de cruzamentos que os animais tratados com salina. Com relação ao *grooming*, a contenção aumentou sua duração total e seu componente corporal, além da frequência de cadeias. Os sujeitos estressados, portanto, emitiram mais comportamento de *grooming* do que os controle. A duração mostrou-se maior principalmente devido ao efeito no componente corporal, já que o nível de rostral se manteve estável entre os grupos. Veloso *et al.* (2016) relataram o aumento do *grooming* corporal exclusivamente nos momentos não-iniciais de exposição à novidade após contenção. Os ratos foram igualmente submetidos a um processo de contenção por 30 minutos e colocados em uma caixa acrílica. Enquanto nos primeiros minutos da sessão o predomínio foi do componente rostral, o corporal apareceu em momentos subsequentes. Segundo os autores, a prevalência do *grooming* corporal sobre o rostral seria um marcador de habituação, portanto, apontando para sua relação com a desexcitação. Os mesmos autores afirmam, ainda, que uma maior quantidade de cadeias estereotipadas foi encontrada em sujeitos submetidos à contenção. Linhagens de ratos mais ansiosas também mostraram maior quantidade de cadeias estereotipadas quando expostos no campo aberto (Estanislau *et al*., 2013). De fato, nosso estudo mostra que mais cadeias foram emitidas por sujeitos estressados e a maior dose do diazepam mostrou-se eficaz em reduzir a frequência de cadeias inclusive em ratos estressados, confirmando os achados na mesma direção. Berridge *et al.* (2005) afirmam que camundongos mutantes hiperdopaminérgicos mostraram maior frequência de cadeias estereotipadas no laboratório (ambiente com ruído branco e luz intensa) quando comparada à frequência medida nas gaiolas-viveiro. Outras formas de estressores têm igualmente causado aumento nas respostas de *grooming*.

Lanum, Campbell, Blick, Knox e Wheeler (1984) submeteram ratos albinos a diferentes tempos de contenção e observaram de que forma ela modulava comportamentos como

grooming, elevação e cruzamentos em um campo aberto. Em seu experimento, apontaram que as contenções superiores a oito horas diminuíram a frequência de elevações (*rearing*), enquanto a contenção de duas horas não teria alterado significantemente esse comportamento. Em nosso experimento, a frequência de elevações mostrou-se alterada apenas nos sujeitos tratado com a dose mais alta de diazepam. A contenção teria maximizado o efeito da droga, alterando não apenas respostas de elevação, mas também de cruzamentos. Como em Lanum *et al.* (1984), não foram encontradas diferenças significativas nos cruzamentos. Isso pode ter se dado devido ao tempo de contenção. Apenas contenções mais prolongadas mostraram efeito sobre comportamentos exploratórios de ratos machos. Contudo, em nosso estudo, a dose de 4 mg/Kg de diazepam mostrou-se capaz de potencializar o efeito da contenção, reduzindo a frequência de cruzamentos apenas nos sujeitos contidos. A interação entre droga e contenção alterou os comportamentos exploratórios.

Kallueff e Tuohima (2005) apontaram uma diminuição na frequência de elevações em sujeitos tratados com doses inferiores de diazepam (0,1 e 0,5 mg/Kg). Com doses maiores, nosso estudo falhou em replicar esses resultados. E as doses utilizadas por eles não alteraram a duração do *grooming*. Nosso estudo não se propôs a analisar as transições incorretas de *grooming*, que são examinadas no estudo citado, mas de que forma o estresse causado por contenção e a droga modulavam outros aspectos das respostas de *grooming*. O efeito da droga pôde ser observado principalmente sobre a frequência de cadeias estereotipadas e no componente corporal, sugerindo que essas medidas de *grooming* estariam relacionadas à desexcitação. Sujeitos estressados emitiram mais cadeias do que os não estressados, e a maior dose do diazepam mostrou-se eficaz em reduzir a frequência das mesmas.

Ratos submetidos ao estresse por contenção foram ou não tratados com diazepam. Os efeitos sobre os comportamentos exploratórios foram evidenciados apenas nos sujeitos tratados com 4 mg/Kg de diazepam, embora a frequência de cruzamentos tenha sido alterada

apenas em sujeitos estressados. O tempo total de *grooming*, seu componente corporal e a frequência de cadeias foram ampliados pelo estresse de contenção, enquanto que apenas a dose mais alta da droga utilizada se mostrou eficaz em reduzir a frequência de cadeias estereotipadas. Nosso estudo demonstrou que o componente corporal é a parte do grooming mais relacionada à desexcitação. O *grooming* corporal mostrou-se sensível, enquanto o rostral permaneceu estável em todos os grupos.

Olhar para o *grooming* como um comportamento único pode não ser tão útil quanto avaliá-lo de acordo com distribuição regional. Nossos resultados indicam que ratos estressados gastam mais tempo com os componentes corporais do *grooming* e, em combinação com resultados obtidos em pesquisas prévias, apontam para a especificidade desse componente enquanto presente na desexcitação. Cadeias estereotipadas são mais frequentes em ratos estressados e apenas uma dose mais alta de diazepam altera comportamentos exploratório e de *grooming*. Futuras pesquisas poderiam avaliar a interação do diazepam com o comportamento de *grooming*, investigando doses a partir de 4 mg/Kg e buscando, ainda, compreender o porquê de doses inferiores (0,1, 0,5 e 1 mg/Kg) apresentarem resultados discrepantes. Como fica clara a relação entre grooming e ansiedade, drogas ansiogênicas poderiam ser testadas, além de outros estressores (inclusive contenções mais prolongadas), avaliando de que forma o *grooming* corporal e as cadeias estereotipadas são moduladas por eles. As cadeias estereotipadas de *grooming* podem mimetizar comportamentos semelhantes aos ocorridos em pessoas com Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC). Dessa forma, em estudos futuros, Seria interessante observar de que forma drogas inibidoras da recaptação da serotonina (ISRS), utilizadas no tratamento do TOC, modulariam as cadeias estereotipadas.

Referências

Albonetti, M. E., & Farabollini, F. (1992, May). Effects of single and repeated restraint on the social behavior of male rats. *Physiology & Behavior*, *53*(5), 937-942.

American Psychiatric Association. (2014). *Manual disgnóstico e estatístico de transtorno DSM-5.* (M. I. Nascimento, Trad.). Porto Alegre: Artmed.

American Psychological Association. (2013). *Stress in America: missing the health care connection.* Recuperado em 21 abril, de https://www.apa.org/news/press/releases/stress/2012/full-report.pdf.

Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005, February). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourete's. *BMC Biology, 3*(4).

Berridge, K., Fentress, J., & Parr, H. (1987, January). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioral Brain Research, 23*(1), 59-68.

Buynitsky, T., & Mostofsky, D. I. (2009, July). Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 33*(7), 1089-1098.

Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology, 67*, 259-284.

Cole, J. C., & Rodgers, R. J. (1995). Ethological comparison of the effects of diazepam and achute/chronic Imipramine on the behavior of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 52*(3), 473-478.

Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Psysiology & Behavior, 97*(3-4), 484-494.

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

Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blásquez, G., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neuroscience Research, 77*(4), 187-201.

Jolles, J., Rompa-Barendregt, J., & Gispen, W. H. (1979, April). Novelty and grooming behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology, 25*(4), 563-572.

Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005, January). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirecitionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology, 508*(1-3), 147-153.

Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016, January). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translatoinal neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience, 17*(1), 45-59.

Katz, R. J., & Roth, K. A. (1979, July). Stress Induced Grooming in the Rat - and endorphin mediated syndrome. *Neuroscience Letters, 13* (2), 209-212.

Klein, Z. A., Padow, V. A., & Romeo, R. D. (2009, January). The effects of stress on play and home cage behaviors in adolescent male rats. *International Journal of Comparative Psychology, 16*(4), 237-246.

Lanum, J., Campbell, M. E., Blick, D. W., Knox, J., & Wheeler, T. G. (1984, June). Effects of restraint on open-field activity, shock avoidance learning, and gastric lesions in the rat. *Animal Learning & Behavior, 12*(2), 195-201.

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009, June). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behavior and cognition. *Nature, 10*(6), 434-445.

Margis, R., Picon, P., Cosner, A. F., & Silveira, R. O. (2003, abril). Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Revista de Psquiatria do Rio Grande do Sul, 25*(Suplemento 1), 65-74.

Miller, L. H., & Smith, A. D. (1994). *The Stress Solution: an action pran to manage the stress in your life.* (L. Rothstein, Ed.). New York: Pocket Books.

Nosek, K., Dennis, K., Andrus, B. M., Ahmadiyeh, N., Baum, A. E., Woods, L. C., & Redei, E. E. (2008, June). Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behavioral and Brain Functions, 4,* 23.

Reimer, A. E., de Oliveira, A. R., Diniz, J. B., Hoexter, M. Q., Chivegatto, S., & Brandão, M. L. (2015, October). Rats with differential self-grooming expression in the elevated plus-maze do not differ in anxiety-related behaviors. *Behavioural Brain Research, 292,* 370-380.

Selye, H. (1936, July). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature, 138,* 32.

Selye, H. (1973, December). The evolution of the stress concept. *American Scientist, 61*(6), 692-699.

Silva, S. R. (2013). *Farmacocinética do Diazepam.* Dissertação de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Spruijt, B., Van Hooff, J., & Gispen, W. (1992, July). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews, 72*(3), 825-52.

Van Erp, A. M., Kruk, M. R., Meelis, W., & Willekens-Bramer, D. (1994, November). 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 and Brain Research, 65*(1), 47-55.

Veloso, A. W., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., & Estanislau, C. (2016, March). Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychology & Neuroscience, 9*(1), 91-104.