



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESA GABRIELE BIBIANO

**RELAÇÕES ENTRE *GROOMING* E ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS REEXPOSTOS A UM CONTEXTO
ASSOCIADO À DERROTA SOCIAL**

Londrina
2019

ANDRESA GABRIELE BIBIANO

**RELAÇÕES ENTRE *GROOMING* E ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS REEXPOSTOS A UM CONTEXTO
ASSOCIADO À DERROTA SOCIAL¹**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento – Universidade Estadual de Londrina –, como cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Celio R. Estanislau.

Londrina

2019

¹O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

B581 Bibiano, Andresa Gabriele.
Relações entre grooming e ansiedade em camundongos reexpostos a um contexto associado à derrota social / Andresa Gabriele Bibiano. - Londrina, 2019.
57 f. : il.

Orientador: Celio Roberto Estanislau.
Dissertação (Mestrado em Análise do Comportamento) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Ansiedade - Tese. 2. Grooming - Tese. 3. Derrota social - Tese. 4. Distância e direção defensivas - Tese. I. Estanislau, Celio Roberto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento. IV. Título.

CDU 159.9

ANDRESA GABRIELE BIBIANO

**RELAÇÕES ENTRE *GROOMING* E ANSIEDADE EM
CAMUNDONGOS REEXPOSTOS A UM CONTEXTO
ASSOCIADO À DERROTA SOCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análise do Comportamento – Universidade Estadual de Londrina –, como cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Análise do Comportamento.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Celio R. Estanislau
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dr. Guilherme Bracarense Filgueiras
Outros

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Universidade Estadual Paulista
(UNESP-Araraquara)

Londrina, 24 de Setembro de 2019.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Edenir e Aparecido Bibiano, por terem me ensinado desde cedo a importância do conhecimento, o que se refletiu na minha escolha por seguir carreira acadêmica e de pesquisadora. Sem o apoio incondicional de vocês esse trabalho não seria possível. Eu os amo mais que tudo nesse mundo.

Ao meu orientador Celio Estanislau, que me recebeu como orientanda de iniciação científica durante a graduação e me incentivou a seguir com essa linha de pesquisa, da qual sinto orgulho em dizer que faço parte. Seu apreço pela ciência e sua dedicação como pesquisador inspiram aqueles que almejam trilhar esse caminho.

Aos demais membros da banca, Dr. Guilherme Filgueiras e prof. Dr. Ricardo Nunes de Souza, por terem aceitado participar da minha qualificação e, enfim, da minha defesa. Seus comentários e sugestões foram de grande valia para o desenvolvimento e aperfeiçoamento da minha pesquisa.

À minha psicóloga Heloíse Mazzia, que teve um papel imprescindível no meu processo de autoconhecimento e enfrentamento de circunstâncias difíceis e desafiadoras. Você fez com que eu acreditasse no meu potencial como pesquisadora e, se esse trabalho pôde ser concluído, devo isso a você.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da qual recebi apoio financeiro para desenvolver essa pesquisa e que permitiu, assim, que eu me dedicasse integralmente a ela. São tempos difíceis para aqueles que desejam seguir carreira acadêmica, mas tenho convicção de que um dia a pesquisa no Brasil terá o devido reconhecimento e incentivo.

Ao meu namorado Taimon Maio, por todo companheirismo durante esses anos. Sua busca incessante pelo conhecimento e seu modo leve de enxergar a vida me inspiram. Ao seu lado sou uma pessoa melhor e mais feliz.

À minha amiga mais antiga e querida, Laiara Ribeiro, por todas as conversas que tornaram esses anos de mestrado mais leves.

Agradeço às minhas amigas da graduação e/ou pós-graduação Ana Gabriela Santos, Fernanda Torres, Eduarda de Oliveira e Marcella Bosquetti, por acreditarem no meu potencial, por me aceitarem como pessoa e pelos cafés semanais.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Psicobiologia, em especial a Rodrigo Klein, Christiane Henriques, Nathalia Hitomi, Thiago Campoli e Lucas Ribeiro, pelas discussões enriquecedoras e companhia agradável.

Por fim, a todos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Bibiano, Andresa Gabriele. **Relações entre *grooming* e ansiedade em camundongos reexpostos a um contexto associado à derrota social**. 2019. 57 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Análise do comportamento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), Brasil.

Resumo

O *grooming* em roedores tem sido proposto como uma medida promissora de ansiedade, não tendo, porém, sua microestrutura detalhadamente avaliada em situações-testes de exposição a uma ameaça potencial. Não teve também seus parâmetros associados à distância e direção defensivas – fatores explicativos sobre comportamentos defensivos em roedores. Justifica-se, assim, a análise do *grooming* na reexposição do camundongo ao contexto onde a derrota social por um coespecífico agressivo ocorreu. Camundongos foram submetidos a três fases experimentais em um aparato com três compartimentos: toca, túnel e superfície. Nos três primeiros dias, os animais exploraram o aparato vazio durante 10 minutos (Fase 1 – Habituação). No quarto dia, os sujeitos do Grupo-Não-Derrotado foram confinados junto a um coespecífico não-agressivo, enquanto os sujeitos do Grupo-Derrotado permaneceram com um coespecífico agressivo até a ocorrência de interação agressiva (Fase 2 – Derrota social). No quinto dia, os animais foram reexpostos ao aparato vazio durante 10 minutos (Fase 3 – Teste de reexposição). As seguintes medidas foram analisadas durante a Fase 3 quanto à sua ocorrência na toca e superfície: medidas espaço-temporais – frequência de entradas, tempo em cada compartimento e latência para atingir a superfície; e medidas de *grooming* – total de episódios, porcentagem de transições incorretas, duração total, frequência de cadeias estereotipadas e duração de *grooming* rostral e caudal. Foram conduzidos três estudos: no Estudo 1, foram comparados animais derrotados e não-derrotados. No Estudo 2, dentre os derrotados, comparou-se animais que apresentaram alta (grupo Alta-Ansiedade) e baixa (grupo Baixa-Ansiedade) frequência de SAP. No Estudo 3, avaliou-se o *grooming* dos animais do grupo Alta-Ansiedade quanto à distância e direção defensivas. Os resultados do Estudo 1 mostraram que animais derrotados e não-derrotados diferiram quanto à latência para atingir a superfície e a porcentagem de transições incorretas ocorridas na superfície, indiciando maior ansiedade no primeiro grupo. No Estudo 2, os animais dos grupos Baixa e Alta-Ansiedade apresentaram diferentes níveis de responsividade ao procedimento realizado e variações comportamentais interpretadas como diferentes estratégias de *coping*. No Estudo 3, os animais do grupo Alta-Ansiedade exibiram maiores índices de *grooming* no espaço protegido (toca) voltados para a fonte de ameaça potencial (superfície), o que pode apontar para um estado de ansiedade e vigilância. Conclui-se que alterações específicas nas medidas de *grooming* parecem informativas sobre o estado de ansiedade em determinados grupos de animais no procedimento de reexposição ao ambiente de derrota social. Os dados também demonstram que o *grooming* parece participar das estratégias de *coping* exercidas por roedores diante de situações potencialmente ameaçadoras e tem a sua ocorrência modulada pelos fatores distância e direção defensivas.

Palavras-chave: ansiedade; *grooming*; derrota social; distância e direção defensivas; *coping*.

Bibiano, Andresa Gabriele. **Relationships between grooming and anxiety in mice reexposed to a context associated with social defeat**. 2019. 57 p. Master's thesis, Behavior Analysis Post Graduation Program, Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR), Brazil.

Abstract

Grooming in rodents has been proposed as a promising measure of anxiety, but its microstructure has not been thoroughly evaluated in test situations of exposure to a potential threat. It also did not have its parameters associated with defensive distance and defensive direction – explanatory factors about defensive behaviors in rodents. This justifies the analysis of grooming in the reexposure of the mouse to the context where social defeat by an aggressive co-specific occurred. Mice were subjected to three experimental phases in an apparatus with three compartments: home chamber, tunnel and surface. In the first three days, the animals explored the empty apparatus for 10 minutes (Phase 1 – Habituation). On the fourth day, the Non-Defeated Group subjects were confined to a nonaggressive co-specific, while the Defeated-Group subjects remained with an aggressive co-specific until aggressive interaction occurred (Phase 2 – Social Defeat). On the fifth day, the animals were reexposed to the empty apparatus for 10 minutes (Phase 3 – Reexposure Test). The following measures were analyzed during Phase 3 for their occurrence in the home chamber and surface: spatiotemporal – frequency of entries, time in compartments and latency to reach the surface; and grooming measures – total of bouts, percentage of incorrect transitions, total duration, frequency of stereotyped chains, and rostral and caudal grooming duration. Three studies were conducted: in Study 1, defeated and non-defeated animals were compared. In Study 2, among the defeated animals, we compared animals that presented high (High-anxiety group) and low (Low-anxiety group) frequency of SAP. In Study 3, the grooming of animals from the High-Anxiety group was evaluated for defensive distance and direction. The results of Study 1 showed that defeated and non-defeated animals differed in terms of latency to reach the surface and percentage of incorrect transitions in surface, indicating greater anxiety in the first group. In Study 2, the animals of the Low and High-Anxiety groups presented different levels of responsiveness to the procedure performed and behavioral variations interpreted as different coping strategies. In Study 3, animals in the High-Anxiety group exhibited higher rates of grooming in the protected area (home chamber) facing the potential threat source (surface), which may point to a state of anxiety and vigilance. It is concluded that specific changes in grooming measures seems informative about the state of anxiety in certain groups of animals in the procedure of re-exposure to the environment of social defeat. The data also show that grooming seems to participate in rodent's coping strategies exerted in potentially threatening situations and has its occurrence modulated by defensive distance and defensive direction.

Keywords: anxiety; grooming; social defeat; defensive distance; defensive direction; coping.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ilustração do aparato experimental, composto pela toca (*home chamber*), túnel (*tunnel*) e área de superfície (*surface*). Retirado de Crestani et al. (2018)..... 23
- Figura 2.** Protótipo da cadeia estereotipada de *grooming*. Os desenhos do camundongo seguem uma sequência cronológica (da esquerda para a direita), cada um representando uma das quatro fases da cadeia de *grooming* [...]. Retirado de Berridge et al., 2005..... 25
- Figura 3.** Representação do delineamento experimental original (Crestani et al., 2018) e das análises realizadas para a presente pesquisa (Estudos 1, 2 e 3)..... 27
- Figura 4.** Medidas de *grooming* na superfície apresentadas por camundongos previamente submetidos (n=15) ou não (n=15) à derrota social [...]. Estudo 1.....32
- Figura 5.** Medidas de *grooming* na toca apresentadas por camundongos previamente submetidos (n=15) ou não (n=15) à derrota social [...]. Estudo 1.....34
- Figura 6.** Medidas de *grooming* na superfície apresentadas por camundongos derrotados que exibiram comportamentos que indicam maior (n=11) e menor (n=11) ansiedade [...]. Estudo 2.....37
- Figura 7.** Medidas de *grooming* na toca apresentadas por camundongos derrotados que exibiram comportamentos que indicam maior (n=11) e menor (n=11) ansiedade. Estudo 2.....39
- Figura 8.** Medidas de *grooming* na superfície e na toca (de costas e de frente para a superfície) apresentadas por camundongos derrotados (n=11) que exibiram comportamentos que indicam maior ansiedade. Estudo 3.....43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Medidas de frequência de entradas e tempo em diferentes compartimentos do aparato experimental. Estudo 1.....	30
Tabela 2. Medidas de frequência de entradas e tempo em diferentes compartimentos do aparato experimental. Estudo 2.....	36
Tabela 3. Medidas espaço-temporais e de <i>grooming</i> avaliadas em camundongos do grupo Baixa-Ansiedade quanto ao seu local de ocorrência. Estudo 2.....	40
Tabela 4. Medidas espaço-temporais e de <i>grooming</i> avaliadas em camundongos do grupo Alta-Ansiedade quanto ao seu local de ocorrência. Estudo 2.....	41

Sumário

Apresentação	11
1 Introdução.....	12
1.1 <i>Grooming</i> e ansiedade	16
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Sujeitos	21
3.2 Escolha do coespecífico agressor	21
3.3 Aparato experimental.....	22
3.4 Procedimento	23
3.5 Medidas comportamentais	25
3.5.1 Avaliação do <i>grooming</i>	25
3.6 Delineamento experimental	26
3.7 Análise de dados.....	28
4 Resultados.....	30
4.1 Estudo 1: Grupo-Derrotado vs. Grupo-Não-Derrotado	30
4.2 Estudo 2: Alta-Ansiedade vs. Baixa-Ansiedade	35
4.2.1 Comparação intergrupos.....	35
4.2.2 Comparação intragrupo.....	40
4.3 Estudo 3: Distância e direção defensivas.....	42
5 Discussão.....	44
5.1 Estudo 1: Grupo-Derrotado vs. Grupo-Não-Derrotado.....	44
5.2 Estudo 2: Alta-Ansiedade vs. Baixa-Ansiedade.....	46
5.3 Estudo 3: Distância e direção defensivas.....	48
6 Discussão geral.....	50
Referências bibliográficas.....	52
Apêndice.....	57

Apresentação

A fim de explorar as relações entre *grooming* e ansiedade, serão discutidos na introdução alguns pontos considerados chave. Inicialmente, será dado um panorama geral sobre o que constitui a ansiedade normal e patológica. Serão discutidos, também, os critérios de validação dos modelos animais de ansiedade, bem como os seus principais aspectos. Posteriormente, serão apresentados os principais comportamentos defensivos observados em situações de ameaça real ou potencial, assim como a definição de distância e direção defensivas – conceitos-chave para uma distinção entre medo e ansiedade. Por fim, será discutida a autolimpeza (*grooming*) de roedores e sua potencial relevância no estudo da ansiedade animal, enfatizando os achados sobre a interferência do estresse de situações de derrota social sobre o *grooming*.

1 Introdução

A ansiedade faz parte do funcionamento humano normal e patológico, constituindo-se de um conjunto de respostas cognitivas, comportamentais e fisiológicas de um indivíduo frente a situações que sinalizam a possibilidade de ocorrência de eventos aversivos. As respostas fisiológicas associadas à ansiedade incluem taquicardia, sudorese, palpitações, náuseas, sensação de formigamento e tremores. As respostas comportamentais estão relacionadas à agitação psicomotora e hipervigilância, ao passo que os aspectos cognitivos abrangem pensamentos associados a catástrofes iminentes, presença de doenças, fracasso e constrangimento social (Graeff, 2012; Nutt, 1990).

As respostas emocionais relacionadas à ansiedade podem ser adaptativas ao contexto, de tal modo que possam favorecer o desempenho do indivíduo em tarefas cognitivas e motoras (de Carvalho-Netto, 2009). Porém, quando excessiva, persistente e desproporcional ao evento que a desencadeou, a ansiedade produz sofrimento significativo e compromete o funcionamento social e ocupacional, sendo considerada, portanto, um Transtorno de Ansiedade (Graeff, 2014).

De acordo com a última versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*American Psychiatric Association*, 2014), a ansiedade patológica ocorre em um conjunto de transtornos que diferem entre si em relação às situações temidas ou evitadas, bem como pelo conteúdo dos pensamentos a elas associadas. Algumas dessas condições incluem as Fobias, o Transtorno de Ansiedade Generalizada e o Transtorno de Pânico – quadros estes que tendem a responder a tratamentos farmacológicos (Baldwin et al., 2005) e psicoterápicos específicos (para uma revisão das terapias validadas, ver *Society of Clinical Psychology, Division 12 of the APA*, 2016).

Segundo estimativas de 2016 da *Global Burden of Disease*, o Brasil é o país com o maior índice de Transtornos de Ansiedade no mundo, atingindo cerca de 9,3% da população (Vos et al., 2016). O quadro se associa ao elevado índice de medicalização, estando os

ansiolíticos entre os três tipos de fármacos mais consumidos no país (Brasil, 2011). Tais aspectos têm impulsionado o desenvolvimento de novas pesquisas experimentais que permitam a compreensão dos quadros de ansiedade. Algumas dessas pesquisas são realizadas com “modelos animais”.

Os modelos animais consistem em manipulações experimentais que visam simular uma psicopatologia humana em animais de laboratório. Possibilitam, dessa forma, a elucidação de mecanismos fisiológicos e comportamentais relacionados a determinadas condições clínicas, sobretudo, os transtornos mentais (Geyer & Markou, 1995). Ressalta-se, no entanto, que dada a dificuldade em simular funções psicológicas complexas em animais, a criação de um modelo requer um processo de validação que permita aferir em que medida determinado teste pode ser empregado com este fim (Graeff, 2012).

Dentre os critérios de validação de modelos animais, três são frequentemente empregados: validade de face, validade preditiva e validade de constructo (Willner, 1984). (a) A validade de face refere-se às similaridades entre os comportamentos exibidos pelo animal e os sinais clínicos de um transtorno (Graeff, 2012). Aponta-se como limitação do critério o fato de que comportamentos similares entre espécies não necessariamente implicam em uma mesma etiologia (Geyer & Markou, 1995). (b) A validade preditiva refere-se ao potencial do modelo em prever os efeitos de intervenções terapêuticas já efetivas; no âmbito farmacológico, traduz-se na sensibilidade do modelo a fármacos que geram atenuação ou agravo dos sintomas, bem como na insensibilidade a drogas que não afetam os sintomas do mesmo quadro (Graeff, 2012). Por fim, (c) a validade de construto refere-se à eficácia do modelo em simular os processos fisiopatológicos e contextuais presumivelmente envolvidos na causalidade de um transtorno (Geyer & Markou, 1995).

De modo geral, os modelos animais de ansiedade simulam situações aversivas, podendo dividir-se em: modelos de condicionamento e modelos etológicos (Rodgers, Cao, Dalvi, &

Holmes, 1997). Os modelos de condicionamento envolvem aprendizagem, podendo-se citar o condicionamento pavloviano de medo ao contexto, o procedimento de supressão condicionada, entre outros. Os modelos etológicos, por sua vez, caracterizam-se por situações aversivas naturais da espécie e que não envolvem treino, como a exposição a ambientes novos e ameaçadores, exposição a predadores e coespecíficos agressivos, entre outros (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012). As respostas fisiológicas, endócrinas e/ou comportamentais exibidas pelos animais nessas condições são utilizadas como medidas de ansiedade, por apresentarem expressivo grau de equivalência com as medidas de ansiedade estudadas em seres humanos (Blanchard, Blanchard, & Rodgers, 1991).

Os parâmetros comportamentais dos modelos de condicionamento supracitados englobam respostas de pressão à barra em um paradigma operante de supressão condicionada, resposta de congelamento e sobressalto ou de esquiva ativa e passiva em procedimentos que envolvem o condicionamento contextual aversivo, entre outros. Já os parâmetros etológicos abrangem comportamentos típicos da espécie, como o enterramento defensivo, a vocalização ultrassônica (Graeff, 2012) e o esticar-se para avaliar o risco (*Stretching Attend Posture – SAP*) (Blanchard et al., 1991).

As medidas etológicas são exemplos de comportamentos defensivos frente a ameaças reais ou potenciais, sendo semelhantes entre diversos mamíferos e possuindo função de sobrevivência (Blanchard, 1997; Yang et al., 2004). A partir da análise desses comportamentos, uma distinção entre medo e ansiedade foi estabelecida pelo casal de pesquisadores Blanchard e Blanchard: o medo decorreria da presença real da ameaça, ao passo que a ansiedade decorreria da presença potencial da mesma (e.g., Blanchard & Blanchard, 2008).

Os comportamentos defensivos de roedores variam de acordo com os fatores situacionais, as características da ameaça e a distância entre o animal e a ameaça (distância defensiva) (Blanchard, 1997). Desse modo, quando o estímulo ameaçador é detectável (e.g.,

predador ou um coespecífico agressivo), algumas reações de defesa são esperadas: (a) Fuga – ação predominante caso exista uma rota de fuga no ambiente; (b) Congelamento – resposta induzida quando a fuga não é possível; (c) Ameaça Defensiva – reações frente à aproximação crescente da ameaça (i.e., vocalização ultrassônica e exibição dos dentes); e (d) Ataque Defensivo – resposta diante do contato iminente com a ameaça (saltar e morder o oponente na região dos olhos e focinho) (Blanchard & Blanchard, 1988). Essas reações – sobretudo a fuga e o ataque defensivo – são características de medo, de tal forma que são representativas do quadro de pânico de seres humanos (Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2001).

Por outro lado, quando a fonte de ameaça é ambígua ou potencial (e.g., odores e sons associados à presença de um predador ou coespecífico agressivo), os animais tendem a realizar comportamentos conhecidos como “avaliação de risco”, de modo a investigar o foco do perigo. Esses comportamentos envolvem a inibição de atividades não defensivas, como alimentação e cuidados com a prole, priorizando a aproximação cuidadosa em direção à fonte de ameaça potencial, o escaneamento visual e olfativo do ambiente e a postura esticada (Blanchard et al., 1991). Tais reações são características de ansiedade, podendo corresponder aos quadros típicos de ansiedade humana, como o Transtorno de Ansiedade Generalizada (Blanchard et al., 2001).

Adicionalmente ao modelo proposto pelo casal Blanchard, Gray e McNaughton (2000) estabeleceram uma distinção entre medo e ansiedade baseada no conceito de direção defensiva. Segundo os autores, o medo opera quando o animal se afasta de uma situação ameaçadora (fuga), enquanto a ansiedade ocorreria quando o animal se aproxima da fonte de perigo (avaliação de risco). No segundo caso, a ansiedade passa a ser compreendida como resultante de um conflito entre dois objetivos opostos: aproximação-afastamento. Uma vez que o conflito é estabelecido, o afastamento é normalmente favorecido em detrimento da aproximação, de modo a proteger o animal (McNaughton & Corr, 2004).

Ressalta-se a existência de um comportamento que pode ocorrer durante e principalmente após situações aversivas, o *grooming* (Estanislau, 2012; Kalueff et al., 2016). A relação entre o *grooming* e os comportamentos defensivos é, no entanto, pouco conhecida. Destaca-se, portanto, a relevância de desenvolverem-se estudos que estabeleçam tal relação, dada a atenção que o *grooming* tem recebido nos últimos anos enquanto medida de ansiedade e potencial indicativo de “des-excitação” (*dearousal*) do roedor frente a situações ansiogênicas.

1.1 *Grooming* e ansiedade

O comportamento de *grooming* consiste em um conjunto de respostas inatas e complexas dirigidas à superfície corporal, como o coçar-se, esfregar-se e lambe-se (Spruijt, Van Hooff, & Gispen, 1992), estando presente em diversas espécies. Em roedores, o *grooming* atua na termorregulação, higienização do pelo e socialização (quando dirigido a um coespecífico). No entanto, o aspecto que mais tem se destacado é a sua relação com o contexto estressor em que ocorre (e.g., exposição à novidade ou a predadores), tornando-o potencialmente informativo nos estudos sobre ansiedade animal (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff et al., 2016).

Destaca-se, por exemplo, que diferentes níveis de aversividade parecem produzir diferentes efeitos sobre o *grooming* (Fernández-Teruel & Estanislau, 2016). Tanto a ausência (Bolles, 1960) como a alta aversividade (Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005; Estanislau et al., 2013) produzem baixos índices, enquanto níveis moderados como a exposição à novidade (e.g., no Teste do campo aberto ou Labirinto em cruz elevado), a habituação a esses contextos ou a pré-exposição a condições estressoras (e.g., após confinamento em um braço aberto do LCE ou restrição física) resultam em níveis elevados de *grooming* (Escorihuela et al., 1999; Estanislau, 2012; Veloso, Filgueiras, Lorenzo, & Estanislau, 2016).

Já no que se refere à caracterização dos episódios de *grooming* em roedores, estes tendem a ocorrer em uma sequência cefalocaudal: movimentos na região do focinho, face e

cabeça do animal, que progressivamente dirigem-se ao corpo, cauda e genitais (Kalueff & Tuohimaa, 2004). Cabe ressaltar que, em cerca de 10-15% desses episódios, ocorrem cadeias sintáticas ou estereotipadas (Kalueff et al., 2016), compostas de quatro fases rigidamente organizadas (i.e., patas dianteiras, focinho, cabeça e corpo) (Berridge et al., 2005). Tais características levaram o *grooming* a ser também considerado como um potencial modelo animal do Transtorno Obsessivo-Compulsivo de seres humanos (Berridge, 1990; Berridge, Fentress, & Parr, 1987; Maio, Filgueiras, Cunha, & Estanislau, 2014). Destaca-se, por fim, a interferência que estressores exercem na sequência cefalocaudal: interrupções dos episódios, transições incorretas e mudanças na distribuição do comportamento em diferentes regiões do corpo do animal (Kalueff & Tuohimaa, 2005b; Komorowska & Pellis, 2004; Veloso et al., 2016).

Alguns estudos indicam que determinados componentes do *grooming* podem possuir significados distintos. O componente rostral – ação de limpeza dirigida à cabeça e às patas do animal – por exemplo, aumenta a sua frequência em alguns contextos ansiogênicos (Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2005b). Já o componente caudal – ação de limpeza dirigida ao corpo, patas, cauda e genitais – parece aumentar tardiamente em testes de ansiedade, o que pode indicar habituação ao contexto (Estanislau et al., 2013; Veloso et al., 2016).

No que se refere aos aspectos neurobiológicos que relacionam o *grooming* e o estresse, pode-se citar que a duração do *grooming* aumenta via administração de diversos peptídeos, como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no núcleo paraventricular hipotalâmico (para uma revisão, ver Spruijt et al., 1992). Uma vez que o *grooming* está relacionado à neurobiologia do estresse e aumenta em determinados contextos, sugeriu-se que este tem como função reduzir a excitação (*dearousal*) do roedor frente a estressores ambientais (Spruijt et al., 1992). Salienta-se, contudo, que esse aumento é tardio, dado que inicialmente o *grooming* é inibido pelo estressor (van Erp, Kruk, Meelis, & Willekens-Bramer, 1994).

Um estressor que tem sido investigado nos estudos sobre o *grooming* é o de derrota social. Diferentes modelos animais são utilizados no intuito de gerar a derrota ou *status* de subordinação em roedores. Algumas características comuns entre esses modelos incluem o uso de ratos ou camundongos machos – devido às relações hierárquicas estabelecidas entre esses animais em seu ambiente natural – e a exposição ao ataque físico por um coespecífico (Martinez, Calvo-Torrent, & Pico-Alfonso, 1998). Um modelo de derrota social amplamente utilizado consiste no paradigma Residente-Intruso, no qual um animal intruso é introduzido em uma gaiola com um coespecífico residente, sendo o primeiro comumente derrotado/agredido pelo segundo (Bartolomucci, Fuchs, Koolhaas, & Ohl, 2009).

A avaliação da duração total do *grooming* nas situações de derrota social tem apresentado resultados divergentes, dependendo do procedimento empregado e do nível de aversividade envolvido. Por exemplo, o efeito na duração do *grooming* em estudos que avaliaram a derrota social contínua ou intermitente variam entre si – i.e., maior ou menor duração dessa resposta (e.g., Ahanou & Drinkenburg, 2016; Raab et al., 1986; Tornatzky & Miczek, 1993). Já estudos que fazem uso de uma única derrota têm demonstrado maior duração do *grooming* entre os animais subordinados (e.g., van Erp et al., 1994), tal como na pesquisa de Crestani, Cipriano, e Nunes-de-Souza (2018), que serviu de base para o presente estudo. Ressalta-se, contudo, que tais trabalhos não investigaram os efeitos desse estressor na microestrutura do *grooming*.

Entre os poucos trabalhos com tal enfoque, pode-se citar o estudo de Kalueff e Tuohimaa (2004), no qual o estresse induzido por um encontro com um coespecífico desconhecido aumentou a frequência e duração do *grooming* em camundongos, bem como a porcentagem de transições incorretas e de episódios interrompidos. A derrota social crônica em camundongos (Denmark et al., 2010) também resultou em índices elevados de transições

cefalocaudais incorretas e de *grooming* rostral, sugerindo que esses animais apresentaram maiores níveis de estresse.

Por fim, sintetiza-se que o *grooming* é uma medida promissora de ansiedade que pode desempenhar um papel de *dearousal* do animal – resposta essa que é estereotipada e que também pode guardar correspondências com o TOC de seres humanos. Ressalta-se, porém, que este não teve sua microestrutura adequadamente avaliada em situações-teste que envolvam a exposição a uma ameaça potencial. Tampouco teve tais parâmetros associados aos fatores “distância” e “direção” defensivas, de modo a possibilitar uma maior compreensão das possíveis relações entre o *grooming* e os comportamentos defensivos típicos de roedores. Tais fatos justificam, por fim, a análise do *grooming* em um procedimento caracterizado pela reexposição do animal a um contexto onde ocorreu a derrota social por um coespecífico agressivo.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar as relações entre *grooming* e ansiedade em camundongos reexpostos a um contexto onde ocorreu a derrota social.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente pesquisa foram:

- a) Estabelecer comparações entre as medidas espaço-temporais de camundongos socialmente derrotados e dos que não foram submetidos à interação agressiva;
- b) Avaliar o comportamento de *grooming* nos grupos de camundongos socialmente derrotados e nos que não foram submetidos à interação agressiva;
- c) Avaliar a relação entre os comportamentos defensivos e o *grooming* nos camundongos socialmente derrotados que apresentam comportamentos que indicam maior e menor ansiedade (ver seção 3.6);
- d) Avaliar a relação entre os comportamentos defensivos e o *grooming* quanto à distância e direção defensivas nos camundongos socialmente derrotados que apresentam comportamentos que indicam maior ansiedade (ver seção 3.6).

3 Materiais e Métodos

O trabalho desenvolvido consistiu em uma colaboração com o Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara. A partir das filmagens do experimento efetuado por Crestani et al. (2018), realizou-se uma coleta de dados a fim de contemplar os objetivos do presente estudo. Para tanto, foram estabelecidos novos critérios de divisão da amostra total original (ver seção 3.6), bem como parâmetros comportamentais detalhados em torno da medida de *grooming* (ver seção 3.5.1) – parâmetros estes não incluídos na análise original.

3.1 Sujeitos

Cento e setenta e nove (N=179) camundongos Suíços machos adultos, com peso entre 30 e 35 gramas, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Campus de Botucatu). Os animais foram alojados no biotério do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (FCF/UNESP) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00). Gaiolas de polipropileno (41cm x 34cm x 16cm) foram utilizadas para abrigar grupos de 9 a 10 animais, os quais tiveram livre acesso à água e alimento, exceto durante os períodos de teste.

A presente pesquisa não foi submetida à avaliação ética em pesquisa com animais, dado que o experimento sobre o qual se baseia já havia recebido a devida aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Araraquara, protocolo CEP/FCF/CAr nº 47/2013.

3.2 Escolha do coespecífico agressor

Durante a habituação dos animais às condições de biotério, um observador treinado identificou os camundongos dominantes de cada gaiola, definidos como os animais que apresentavam comportamentos espontâneos de agressão dirigidos aos seus coespecíficos. Esses camundongos foram mantidos isolados em gaiolas individuais (28 x 17 x 12cm) por pelo menos quatro semanas, a fim de intensificar seu comportamento agressivo.

3.3 Aparato experimental

O equipamento experimental utilizado consistiu em uma adaptação do aparato do Teste de Exposição ao Rato (*Rat Exposure Test – RET*), desenvolvido e posteriormente validado pelo grupo de pesquisa de Blanchard e Blanchard (Yang et al., 2004). Este aparato possui três compartimentos conectados entre si: toca, túnel e superfície (Figura 1). A (a) toca (7 x 7 x 12cm) consiste em uma caixa de acrílico preto coberta por uma tampa; um lado da câmara é feito de acrílico transparente, a fim de facilitar as filmagens. A (b) área de superfície (23 × 24 × 21cm) é uma gaiola de policarbonato transparente coberta por uma tampa de policarbonato preto. A toca é conectada à área de superfície por um (c) túnel de tubo de acrílico transparente (4,4cm de diâmetro, 13cm de comprimento e elevado 1,5cm acima do piso das duas câmaras).

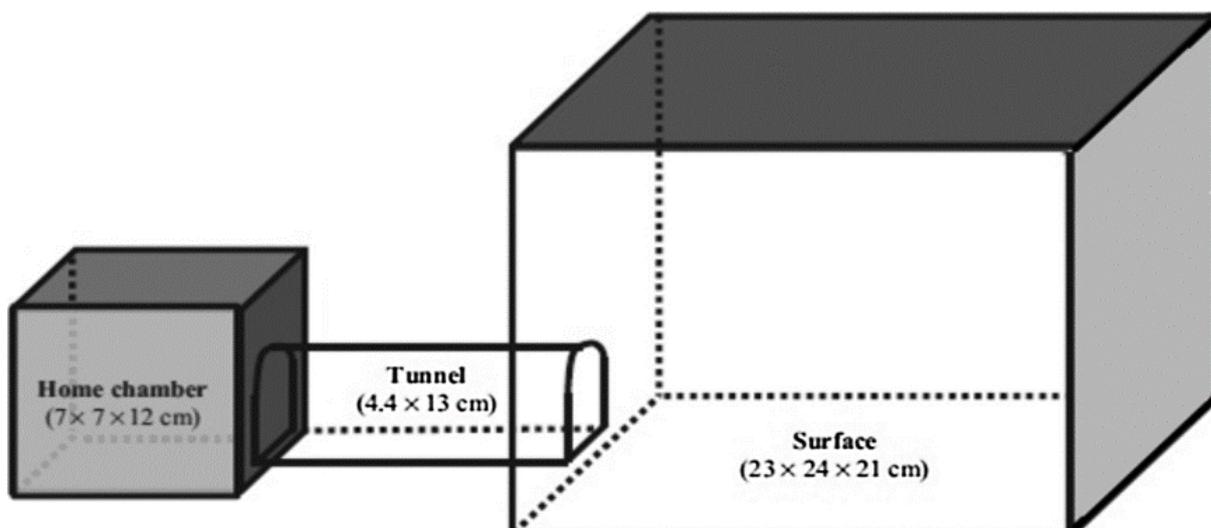


Figura 1. Ilustração do aparato experimental, composto pela toca (*home chamber*), túnel (*tunnel*) e área de superfície (*surface*). Retirado de Crestani et al. (2018).

O aparato do RET sofreu modificações de modo a ser utilizado para gerar a derrota social e *status* de subordinação em metade dos camundongos. No aparato original (Yang et al., 2004), a área de superfície é dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais por uma tela de malha de arame, impedindo o contato direto entre os animais. No protocolo experimental realizado, essa tela foi retirada e o contato entre o camundongo agressivo e o subordinado possibilitado.

3.4 Procedimento

O protocolo experimental foi dividido em três fases realizadas durante a fase clara do ciclo (08:00 – 14:00 h), sob iluminação de uma lâmpada de 100W, conforme segue:

a) Fase 1 – Habituação: a fase de habituação ocorreu durante os três primeiros dias em intervalos de 24 horas. Durante esse período, cada camundongo era colocado na toca e podia explorar todo o aparato vazio durante 10 minutos. Os dados obtidos no terceiro dia determinaram a distribuição dos animais em dois grupos experimentais equivalentes, de acordo com a latência (em segundos) para que os camundongos

atingissem a área de superfície. Na sequência do procedimento, um viria a ser o Grupo-Derrotado (n=89) e o outro o Grupo-Não-Derrotado (n=90).

b) Fase 2 – Derrota social: no quarto dia, cada camundongo era posicionado na toca e podia explorar livremente o aparato. Ao atingir a área de superfície, o animal era confinado nesse compartimento e um coespecífico – agressivo ou não-agressivo – era introduzido no local. Os animais do Grupo-Derrotado foram alocados junto a um coespecífico agressivo, de modo que a interação agressiva ocorresse. Os ataques eram interrompidos assim que o sujeito experimental apresentasse postura de submissão – i.e., elevar o corpo sobre as patas traseiras, estender as patas dianteiras em direção ao agressor, retraindo a cabeça e arqueando as orelhas (Bartolomucci et al., 2009) – por pelo menos cinco segundos ou após cinco minutos de interação agressiva sem demonstração de tal postura. Já os camundongos do Grupo-Não-Derrotado foram confinados junto a um coespecífico não-agressivo (habitante de sua mesma gaiola) durante cinco minutos. Essa fase teve por objetivo promover o processo de condicionamento contextual aversivo nos animais do Grupo-Derrotado, por meio da associação do estressor de derrota social com a área de superfície.

c) Fase 3 – Teste de reexposição: no quinto dia, cada camundongo era colocado na toca e podia explorar o aparato vazio durante 10 minutos.

Em cada uma das fases supracitadas, o aparato experimental foi higienizado com solução de Etanol (20%) e seco com toalhas de papel de modo a evitar pistas olfativas entre os sujeitos. As filmagens do experimento foram realizadas por meio de uma câmera de vídeo acoplada à sala de testes. O registro das medidas comportamentais foi executado por um observador treinado utilizando-se o software *X-Plo-Rat*, desenvolvido por Chaim e Morato (2005).

3.5 Medidas comportamentais

Os parâmetros comportamentais avaliados compreenderam medidas espaço-temporais e de *grooming*. As medidas espaço-temporais incluíram frequência de entradas e tempo despendido em cada compartimento do aparato (toca, túnel e superfície), além da latência (em segundos) para o animal atingir a área de superfície. As medidas de *grooming* estão descritas na seção 3.5.1. Todas as medidas foram analisadas durante a Fase 3 do protocolo experimental (i.e., Teste de reexposição).

3.5.1 Avaliação do *grooming*

O comportamento de *grooming* foi mensurado quanto à frequência e tempo dos episódios, que podem conter ou não estereotípias (i.e., cadeias estereotipadas). Em todos os episódios foram registrados quatro tipos de movimentos (fases) que compõem a cadeia estereotipada (Figura 2), tal como descrita por Berridge et al. (2005):

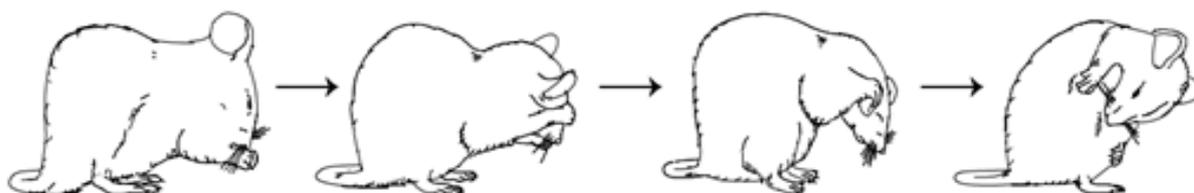


Figura 2. Protótipo da cadeia estereotipada de *grooming*. Os desenhos do camundongo seguem uma sequência cronológica (da esquerda para a direita), cada um representando uma das quatro fases da cadeia de *grooming*. Fase 1: série de fortes movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do focinho; as patas dianteiras geralmente se alternam como trajetórias de movimentos maiores e menores. Fase 2: série de movimentos unilaterais, cada um efetuado por uma pata, que atingem as vibrissas mistaciais abaixo dos olhos. Os camundongos costumam realizar movimentos híbridos das Fases 1 e 2, nos quais uma pata faz o movimento unilateral da Fase 2, enquanto a outra faz um curto movimento de elipse da Fase 1. Fase 3: série de movimentos bilaterais realizados simultaneamente por ambas as patas. As patas se estendem para trás e para cima, elevando-se o suficiente para passarem pelas orelhas e, em seguida, descendo juntas em direção à face do animal. Fase 4: movimentos de lambidas nas regiões ventrais e laterais do tronco que se estendem à cauda do animal, conforme a sequência típica cefalocaudal dos episódios de *grooming*. Retirado de Berridge et al., 2005.

O registro do *grooming* de acordo com as quatro fases da cadeia estereotipada deu suporte para a análise da frequência de transições corretas e incorretas. Transições corretas seguem uma sequência estritamente cefalocaudal (fases 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-0; “0” corresponde a não-*grooming*), ao passo que transições incorretas são caracterizadas pela omissão ou inversão de uma ou mais fases. A frequência de cadeias estereotipadas também foi registrada.

O *grooming* também foi avaliado segundo duas divisões: rostral e caudal (Estanislau et al., 2013; Komorowska & Pellis, 2004). O tempo somado das fases 1, 2 e 3 da cadeia estereotipada correspondeu ao *grooming* rostral, ao passo que o tempo somado da fase 4 correspondeu ao *grooming* caudal. Um episódio de *grooming* consistiu na soma de tempo de toda atividade de *grooming* realizada e de interrupções menores que cinco segundos; interrupções maiores que cinco segundos marcaram um novo episódio; o tempo total de *grooming* consistiu na soma do tempo de todos os episódios.

As medidas de *grooming* supracitadas foram utilizadas para comparações intra e intergrupos (ver seção 3.6), tendo como parâmetro a sua ocorrência na toca, túnel e superfície do aparato experimental.

3.6 Delineamento experimental

A avaliação das relações entre *grooming* e ansiedade em camundongos reexpostos a um contexto onde ocorreu a derrota social foi realizada mediante três estudos. A Figura 3 apresenta uma ilustração do delineamento original (Crestani et al., 2018), seguido das análises realizadas para a presente pesquisa.

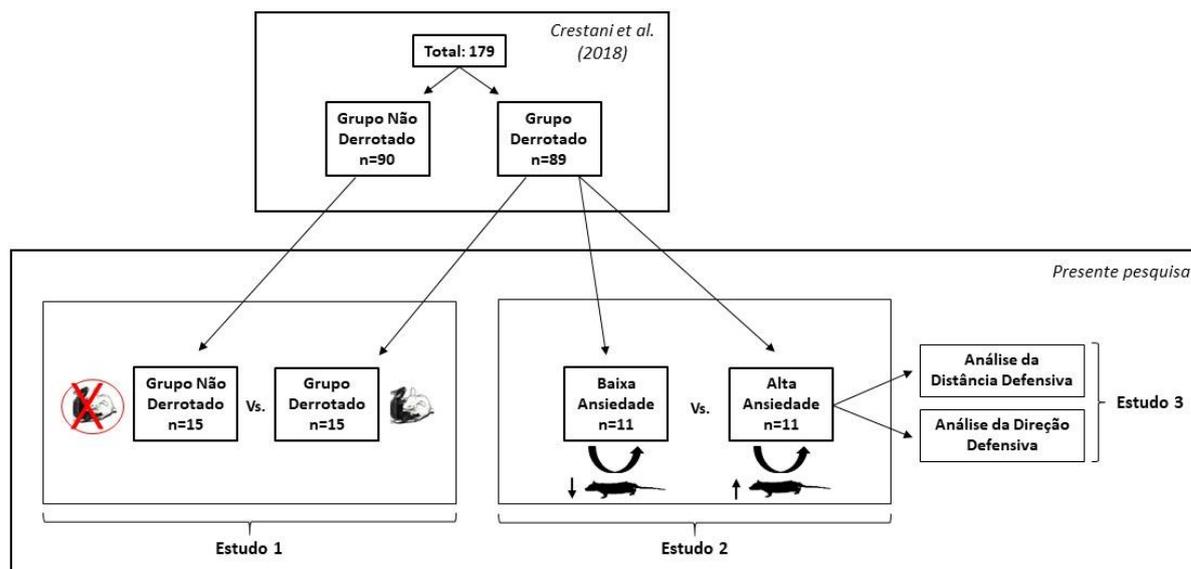


Figura 3. Representação do delineamento experimental original (Crestani et al., 2018) e das análises realizadas para a presente pesquisa (Estudos 1, 2 e 3).

- a) **Estudo 1 – Grupo-Derrotado vs. Grupo-Não-Derrotado:** 15 camundongos do Grupo-Derrotado e 15 do Grupo-Não-Derrotado foram randomicamente selecionados para esta primeira análise. Os animais de cada grupo foram comparados quanto às medidas espaço-temporais e de *grooming* anteriormente descritas (comparação intergrupos).
- b) **Estudo 2 – Alta-Ansiedade vs. Baixa-Ansiedade:** dois extremos (cada um com aproximadamente 12% da amostra original) do Grupo-Derrotado formaram dois novos grupos: grupo Alta-Ansiedade (n=11), que abrangeu os animais que apresentaram maior frequência do comportamento de esticar-se para avaliar o risco (SAP) e grupo Baixa-Ansiedade (n=11), composto por aqueles que exibiram menor frequência de SAP. Nos casos em que animais de um mesmo grupo apresentaram a mesma frequência de SAP, um segundo critério foi empregado para desempate: menor ou maior tempo de permanência na superfície (para o grupo Alta-Ansiedade e Baixa-Ansiedade, respectivamente). Os dados de frequência de SAP e tempo na superfície encontram-se no Apêndice. Os grupos foram comparados quanto às

medidas espaço-temporais e de *grooming* já descritas (comparação intergrupos). Além disso, foi realizada uma comparação intragrupo de modo a verificar se haviam diferenças entre as medidas espaço-temporais e de *grooming* quanto ao seu local de ocorrência – i.e., na toca ou superfície do aparato experimental.

- c) **Estudo 3 – Distância e direção defensivas:** os camundongos da análise anterior que compuseram o grupo Alta-Ansiedade (n=11) foram avaliados quanto à distância e direção defensivas e a ocorrência de *grooming* em cada um desses parâmetros (comparação intragrupo). A distância defensiva refere-se à distância na qual o *grooming* ocorre em relação à fonte de ameaça potencial (i.e., na toca ou superfície – ambiente presumivelmente mais ansiogênico). Já a direção defensiva teve como parâmetro a ocorrência de *grooming* na toca com o animal voltado à fonte de ameaça potencial ou em oposição a ela (i.e., direção do focinho em relação à área de superfície onde ocorreu o evento estressor).

3.7 Análise de dados

As comparações intra e intergrupos foram realizadas tendo-se como parâmetro as seguintes medidas: espaço temporais – frequência de entradas na toca, túnel e superfície, tempo despendido nesses três compartimentos e latência para atingir a superfície; e de *grooming* – total de episódios, porcentagem de transições incorretas, frequência de cadeias estereotipadas, duração total e duração de *grooming* rostral e caudal. Cabe ressaltar que, para a avaliação da porcentagem de transições incorretas, utilizou-se somente os animais que realizaram *grooming* nos compartimentos em estudo.

Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade, utilizando-se para isto os testes *Shapiro-Wilk* e *Levene* ($p \geq 0,01$). Dados que não atingiram os critérios de normalidade e homogeneidade foram transformados em raiz quadrada ou logaritmo a fim de serem normalizados para aplicação da estatística paramétrica. Nos casos em que os dados

transformados também não alcançaram os critérios de normalidade e homogeneidade estabelecidos, executou-se a estatística não-paramétrica.

No Estudo 1 (comparação intergrupos), dados que atingiram os critérios de normalidade e homogeneidade foram submetidos à análise paramétrica por meio do Teste *t* de *Student* para amostras independentes, ao passo que aqueles que não os preencheram foram submetidos à análise não-paramétrica por meio do Teste *U* de *Mann-Whitney*.

No Estudo 2, foram realizadas comparações intra e intergrupos. Para a comparação intragrupo, dados normais e homogêneos foram conduzidos à análise paramétrica por meio do Teste *t* de *Student* para amostras dependentes, enquanto aqueles dados que não atingiram os critérios de normalidade e homogeneidade estabelecidos foram conduzidos à análise não-paramétrica mediante o Teste de *Wilcoxon* para amostras dependentes. Quanto à comparação intergrupos, empregou-se o Teste *t* de *Student* para amostras independentes nos casos em que os dados se mostraram normais e homogêneos, enquanto o Teste *U* de *Mann-Whitney* foi utilizado quando os dados se mostraram não-normais e não-homogêneos.

No Estudo 3 (comparação intragrupo), visto que os dados não alcançaram os critérios de normalidade e homogeneidade exigidos, esses foram submetidos à análise não-paramétrica por meio do Teste de *Friedman*, seguido pelo Teste *post-hoc* de comparações múltiplas de *Dunn*. Uma vez que poucos animais do grupo Alta-Ansiedade realizaram *grooming* na superfície do aparato (ver resultados do Estudo 2, seção 4.2), a avaliação da porcentagem de transições incorretas considerou somente os índices obtidos na toca. Nesse caso, empregou-se o Teste de *Wilcoxon* para amostras dependentes.

Para todas as análises, o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4 Resultados

A apresentação dos resultados foi dividida em subseções, conforme cada estudo realizado. Cabe ressaltar que, não havendo registros de *grooming* no túnel do aparato, os resultados referentes a esse compartimento não foram acrescentados.

4.1 Estudo 1: Grupo-Derrotado vs. Grupo-Não-Derrotado

Relativo às medidas espaço-temporais, o Teste *t* de *Student* não apontou diferenças significativas entre o Grupo-Derrotado e Grupo-Não-Derrotado quanto à frequência de entradas na toca ($t_{(28)}=1,276$; $p>0,05$), túnel ($t_{(28)}=1,308$; $p>0,05$) e superfície ($t_{(28)}=1,347$; $p>0,05$), bem como no tempo de permanência nesses três compartimentos [toca ($t_{(28)}=0,904$; $p>0,05$); túnel ($t_{(28)}=0,242$; $p>0,05$); superfície ($t_{(28)}=1,062$; $p>0,05$)]. O mesmo teste identificou diferenças significativas somente em relação à latência para atingir a superfície, de modo que os animais do Grupo-Derrotado apresentaram maior latência ($t_{(28)}=2,845$; $p\leq 0,05$) em relação aos do Grupo-Não-Derrotado. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1.

Medidas¹ de frequência de entradas e tempo em diferentes compartimentos do aparato experimental. Estudo 1.

Medidas	Grupo-Não-Derrotado	Grupo-Derrotado
Nº de entradas na toca	14,0 ± 1,7	11,1 ± 1,3
Nº de entradas no túnel	27,4 ± 3,6	21,4 ± 2,8
Nº de entradas na superfície	14,5 ± 1,8	11,2 ± 1,5
Tempo na toca (s)	226,5 ± 34,7	274,2 ± 39,6
Tempo no túnel (s)	49,4 ± 6,1	51,7 ± 7,4
Tempo na superfície (s)	324,1 ± 30,4	274,0 ± 35,9
Latência para atingir a superfície (s)	3,8 ± 0,5	13,0 ± 3,7*

¹As medidas estão apresentadas como médias (\pm E.P.M.).

*, $p\leq 0,05$ em comparação ao outro grupo (Teste *t* de *Student*).

Referente às medidas de *grooming* que ocorreram na superfície (Figura 4), os Testes *t* de *Student* e de *Mann-Whitney* não demonstraram diferenças significativas entre os grupos quanto ao total de episódios (*Mann-Whitney*; $p > 0,05$), duração total de *grooming* ($t_{(28)} = 0,517$; $p > 0,05$), frequência de cadeias estereotipadas (*Mann-Whitney*; $p > 0,05$), assim como na duração de *grooming* rostral ($t_{(28)} = 1,604$; $p > 0,05$) e caudal (*Mann-Whitney*; $p > 0,05$). Os grupos diferiram entre si somente em relação à porcentagem de transições incorretas – essas maiores entre os animais do Grupo-Derrotado ($t_{(20)} = 2,090$; $p \leq 0,05$).

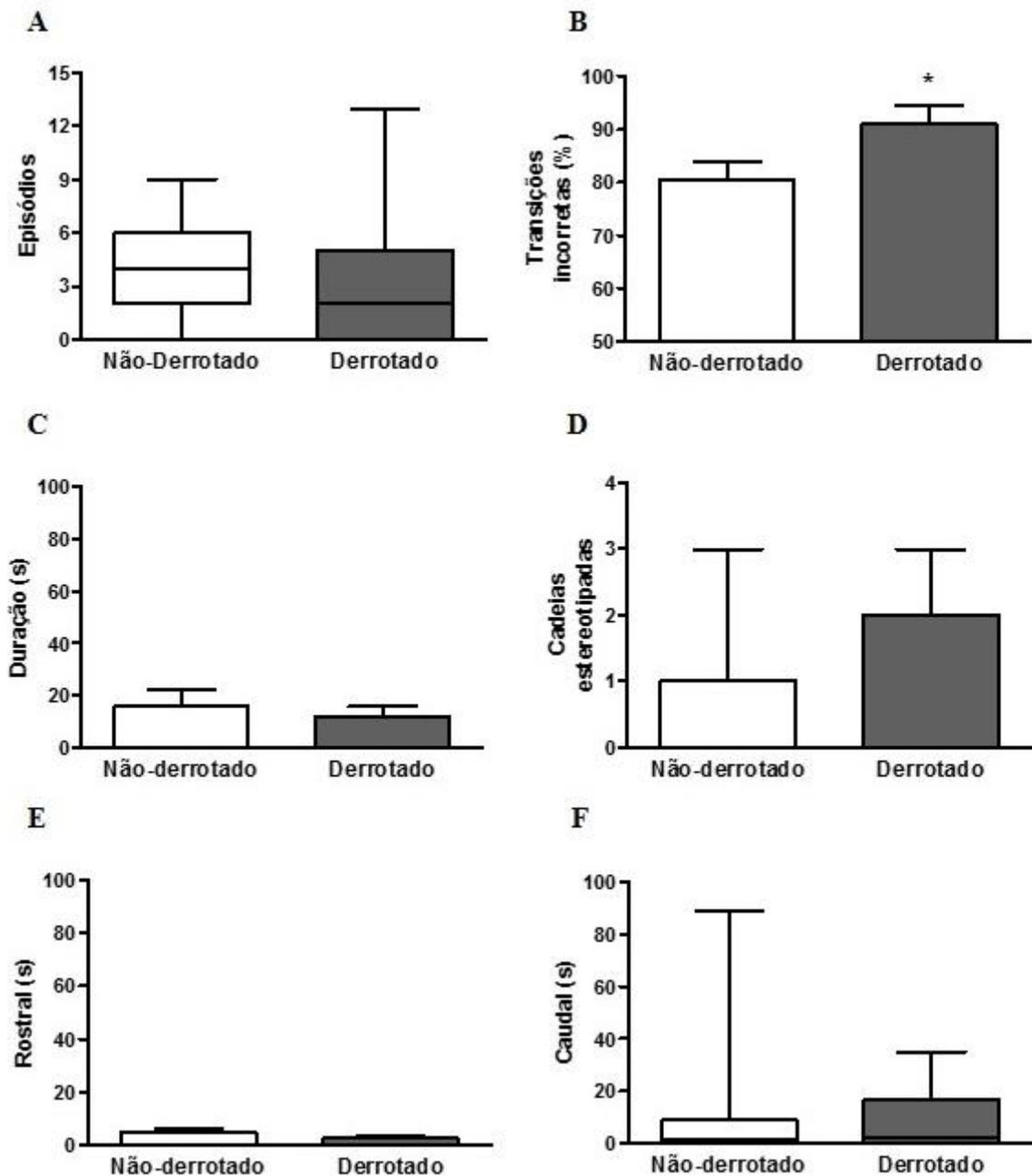


Figura 4. Medidas de *grooming* na superfície apresentadas por camundongos previamente submetidos (n=15) ou não (n=15) à derrota social: (A) total de episódios, (B) porcentagem de transições incorretas (Grupo-Não-Derrotado, n=12; Grupo-Derrotado, n=10), (C) duração total de *grooming*, (D) frequência de cadeias estereotipadas, (E) duração de *grooming* rostral e de (F) *grooming* caudal. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.) ou mediana (I.I.Q.). Estudo 1.

*, $p \leq 0,05$ em comparação ao outro grupo (Teste t de Student).

As medidas de *grooming* ocorridas na toca apresentaram resultados semelhantes às aquelas obtidas na superfície (Figura 5). O Teste *t* de *Student* não apontou diferenças significativas entre os grupos concernentes ao total de episódios ($t_{(28)}=0,275$; $p>0,05$), duração total de *grooming* ($t_{(28)}=1,249$; $p>0,05$), frequência de cadeias estereotipadas ($t_{(28)}=1,548$; $p>0,05$), bem como na duração de *grooming* rostral ($t_{(28)}=1,007$; $p>0,05$) e caudal ($t_{(28)}=1,345$; $p>0,05$). A porcentagem de transições incorretas, desta vez, não se mostrou uma medida de discrepância entre os animais derrotados e não-derrotados ($t_{(25)}=0,665$; $p>0,05$).

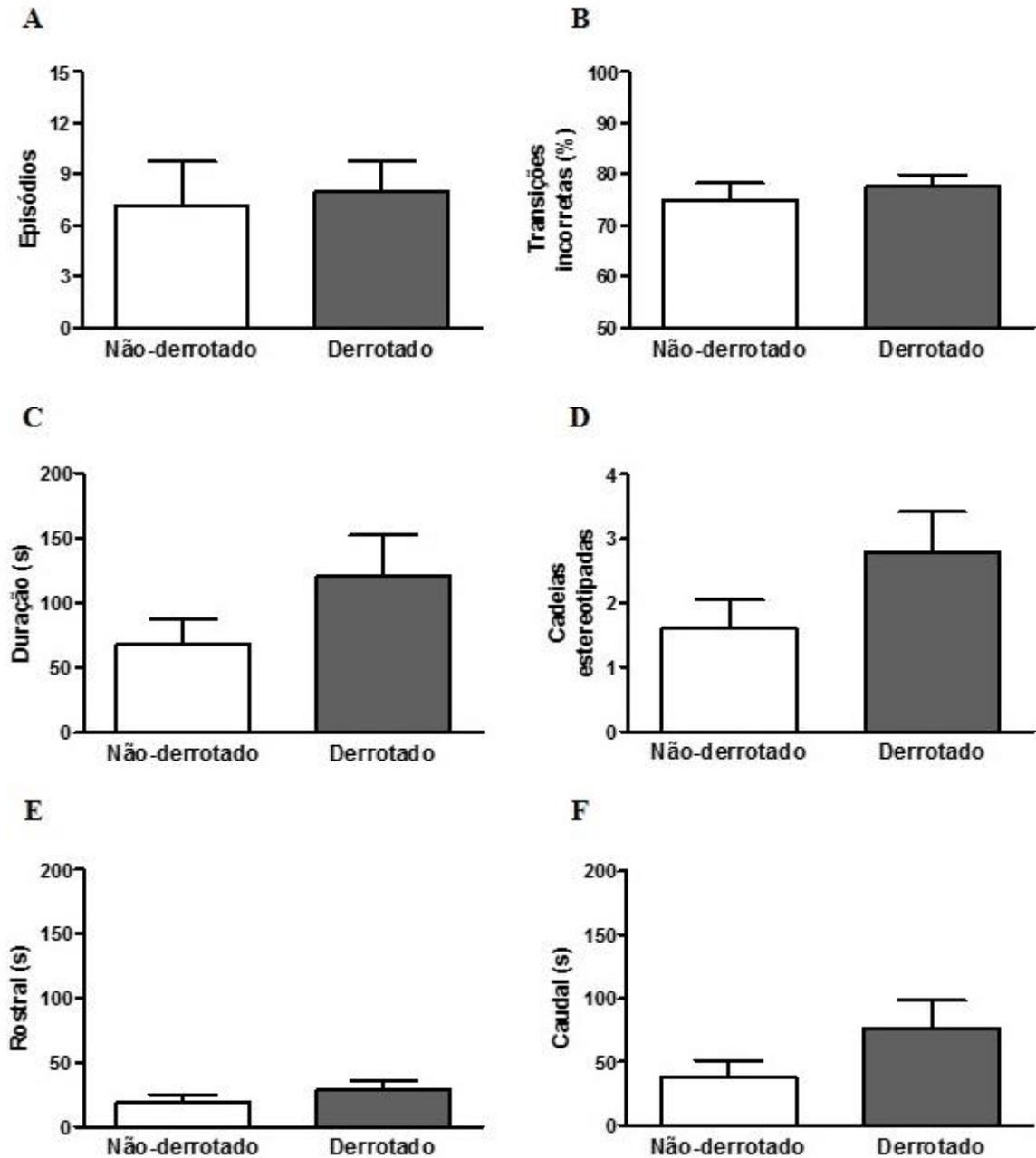


Figura 5. Medidas de *grooming* na toca apresentadas por camundongos previamente submetidos (n=15) ou não (n=15) à derrota social: (A) total de episódios, (B) porcentagem de transições incorretas (Grupo-Não-Derrotado, n=14; Grupo-Derrotado, n=13), (C) duração total de *grooming*, (D) frequência de cadeias estereotipadas, (E) duração de *grooming* rostral e de (F) *grooming* caudal. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.). Estudo 1.

4.2 Estudo 2: Alta-Ansiedade vs. Baixa-Ansiedade

4.2.1 Comparação intergrupos

Concernente às medidas espaço-temporais (Tabela 2), o Teste *t* de *Student* apontou diferenças significativas quanto à frequência de entradas no túnel ($t_{(20)}=2,425$; $p\leq 0,05$) e na superfície ($t_{(20)}=3,510$; $p\leq 0,05$), de modo que os animais do grupo Alta-Ansiedade apresentaram um menor número de entradas nesses dois compartimentos em comparação aos do grupo Baixa-Ansiedade. O mesmo teste não apontou diferenças significativas entre os grupos no quesito frequência de entradas na toca ($t_{(20)}=1,099$; $p>0,05$).

No que tange ao tempo despendido na toca, o Teste *t* de *Student* demonstrou diferenças significativas, de forma que os animais do grupo Alta-Ansiedade passaram mais tempo nesse local em relação aos do grupo Baixa-Ansiedade ($t_{(20)}=5,256$; $p\leq 0,05$). Quanto ao tempo médio no túnel, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($t_{(20)}=1,122$; $p>0,05$). Por fim, referente ao tempo na superfície, o grupo Alta-Ansiedade despendeu menos tempo nesse compartimento do que o grupo Baixa-Ansiedade ($t_{(20)}=5,276$; $p\leq 0,05$).

A latência de chegada à superfície apresentou um índice estatístico limítrofe ($p=0,062$) quanto ao índice de significância adotado, o que indica uma tendência de maior latência entre os animais do grupo Alta-Ansiedade em comparação aos do grupo Baixa-Ansiedade ($t_{(20)}=1,970$; $p>0,05$).

Tabela 2.

Medidas¹ de frequência de entradas e tempo em diferentes compartimentos do aparato experimental. Estudo 2.

Medidas	Grupo Baixa-Ansiedade	Grupo Alta-Ansiedade
Nº de entradas na toca	15,5 ± 1,8	18,2 ± 1,6
Nº de entradas no túnel	28,9 ± 3,5	17,6 ± 3,0*
Nº de entradas na superfície	22,3 ± 2,6	10,7 ± 2,0*
Tempo na toca (s)	148,9 ± 19,2	380,7 ± 39,7*
Tempo no túnel (s)	61,8 ± 7,5	47,2 ± 10,5
Tempo na superfície (s)	389,3 ± 24,6	172,0 ± 32,9*
Latência para atingir a superfície (s)	6,3 ± 1,8	34,4 ± 19,1

¹As medidas estão apresentadas como médias (\pm E.P.M.).

*, $p \leq 0,05$ em comparação ao outro grupo (Teste t de *Student*).

Os índices de *grooming* ocorridos na superfície encontram-se na Figura 6. Concernente ao total de episódios, duração total de *grooming*, frequência de cadeias estereotipadas e duração de *grooming* rostral e caudal, o grupo Alta-Ansiedade apresentou índices inferiores aos do grupo Baixa-Ansiedade (para todos, *Mann-Whitney*; $p \leq 0,05$). A avaliação da porcentagem de transições incorretas, por outro lado, não apontou diferenças significativas entre os grupos (*Mann-Whitney*; $p > 0,05$).

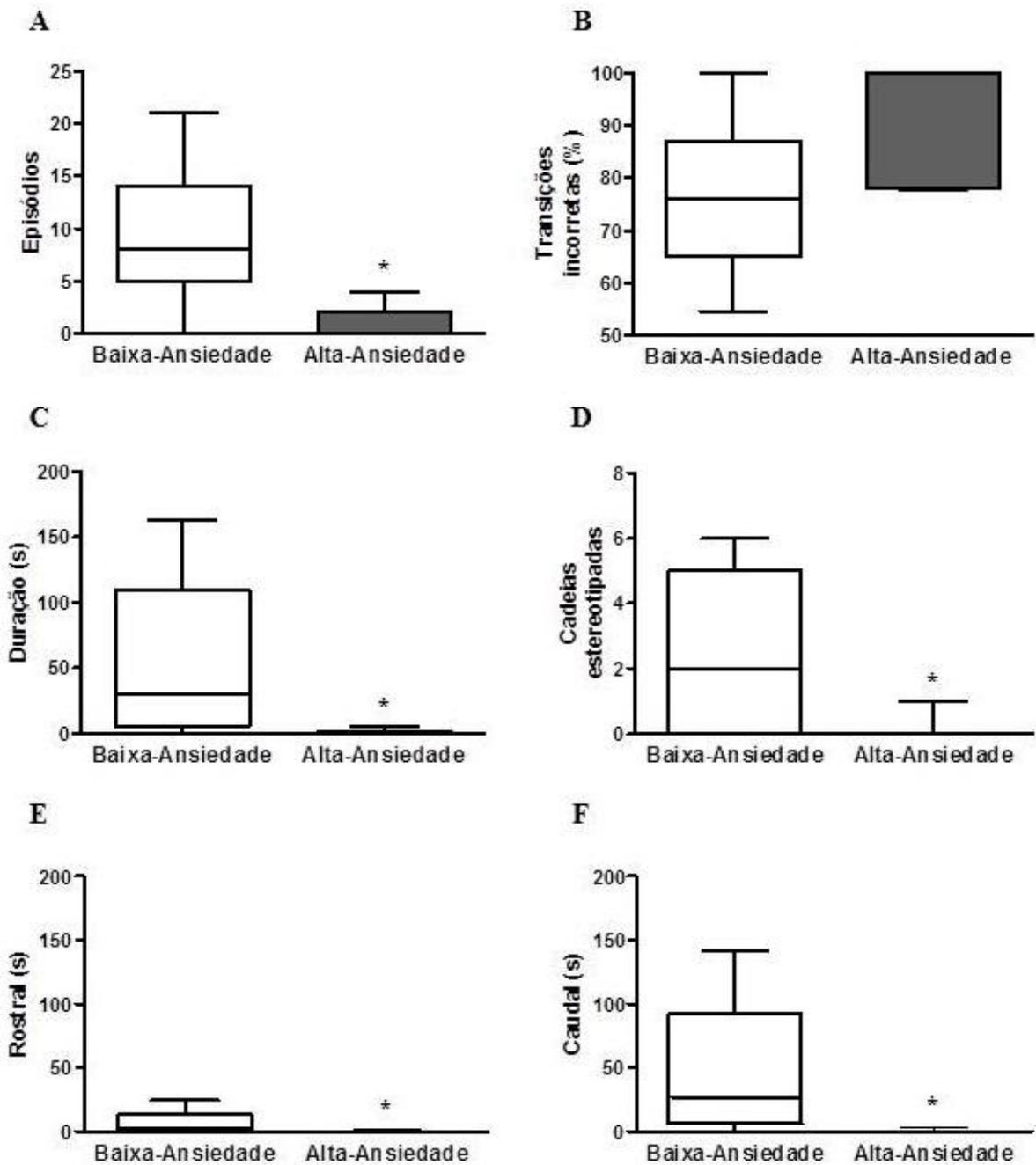


Figura 6. Medidas de *grooming* na superfície apresentadas por camundongos derrotados que exibiram comportamentos que indicam maior (n=11) e menor (n=11) ansiedade: (A) total de episódios, (B) porcentagem de transições incorretas (Baixa-Ansiedade, n=10; Alta-Ansiedade, n=5), (C) duração total de *grooming*, (D) frequência de cadeias estereotipadas, (E) duração de *grooming* rostral e de (F) *grooming* caudal. Os dados estão representados pela mediana (I.I.Q.). Estudo 2.

*, $p \leq 0,05$ em comparação ao outro grupo (Teste de *Mann-Whitney*).

Referente à ocorrência de *grooming* na toca (Figura 7), o grupo Alta-Ansiedade apresentou índices maiores do que o grupo Baixa-Ansiedade nas seguintes medidas: total de episódios ($t_{(20)}=4,166$; $p\leq 0,05$), duração total de *grooming* ($t_{(20)}=5,702$; $p\leq 0,05$), frequência de cadeias estereotipadas ($t_{(20)}=5,754$; $p\leq 0,05$), bem como na duração de *grooming* rostral ($t_{(20)}=4,576$; $p\leq 0,05$) e caudal ($t_{(20)}=4,326$; $p\leq 0,05$). A porcentagem de transições incorretas novamente não se mostrou uma medida de discrepância entre os grupos (*Mann-Whitney*; $p>0,05$).

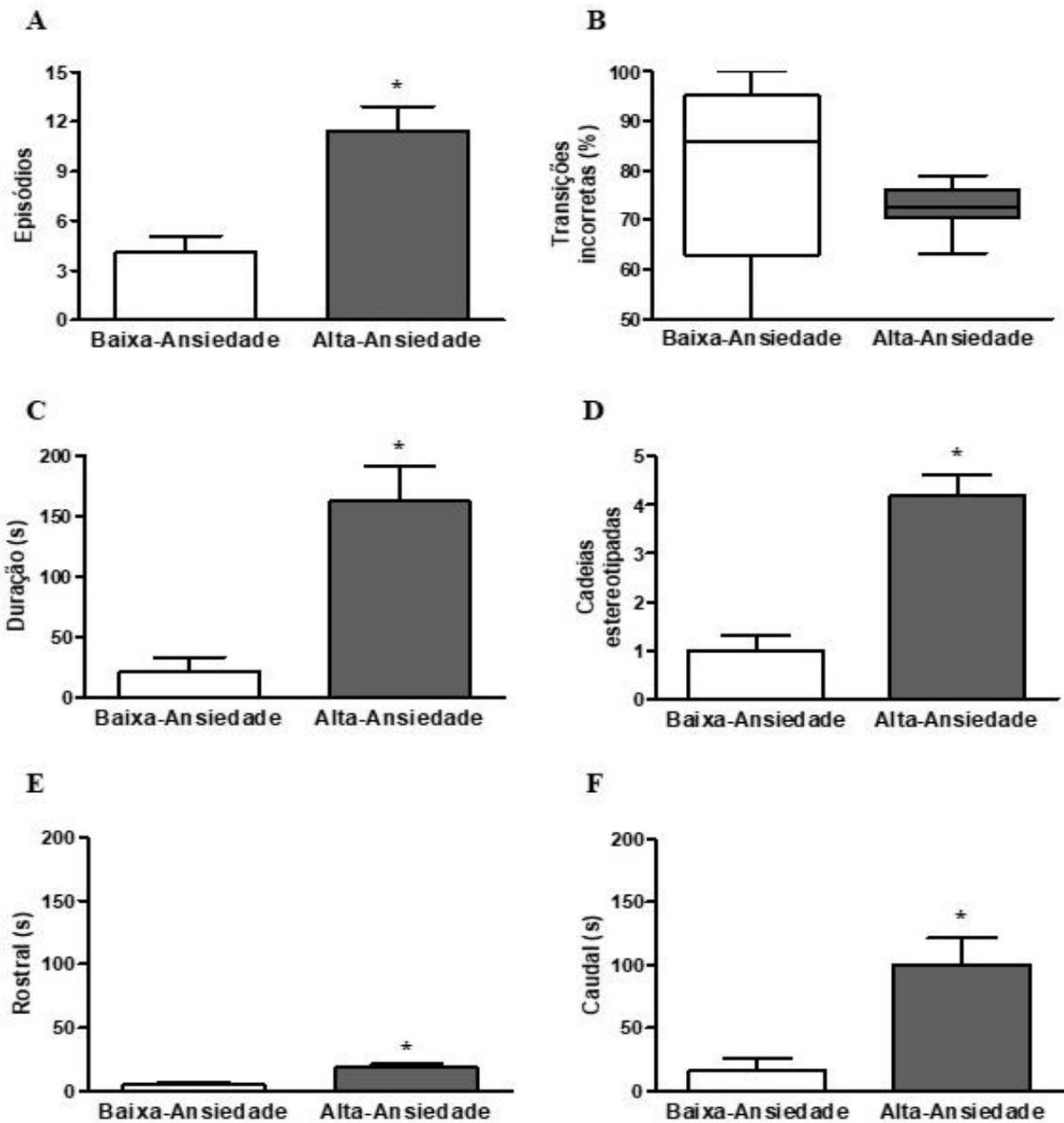


Figura 7. Medidas de *grooming* na toca apresentadas por camundongos derrotados que exibiram comportamentos que indicam maior (n=11) e menor (n=11) ansiedade: (A) total de episódios, (B) porcentagem de transições incorretas (Baixa-Ansiedade, n=9; Alta-Ansiedade, n=11), (C) duração total de *grooming*, (D) frequência de cadeias estereotipadas, (E) duração de *grooming* rostral e de (F) *grooming* caudal. Os dados estão representados pela média (\pm E.P.M.) ou mediana (I.I.Q.). Estudo 2.

*, $p < 0,05$ em comparação ao outro grupo (Teste t de Student).

4.2.2 Comparação intragrupo

No que diz respeito ao grupo Baixa-Ansiedade, o Teste *t* de *Student* demonstrou diferenças significativas quanto ao local de ocorrência das medidas espaço-temporais, de modo que os animais desse grupo realizaram um maior número de entradas na superfície e passaram mais tempo nesse local em comparação à toca. Os Testes *t* de *Student* e de *Wilcoxon* não demonstraram diferenças quanto ao local de ocorrência das medidas de *grooming* – total de episódios, porcentagem de transições incorretas, duração total de *grooming*, frequência de cadeias estereotipadas, duração de *grooming* rostral e de *grooming* caudal. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3.

Medidas¹ espaço-temporais e de *grooming* avaliadas em camundongos do grupo Baixa-Ansiedade quanto ao seu local de ocorrência. Estudo 2.

Grupo Baixa-Ansiedade	Toca	Superfície	Nível de significância
Medidas espaço-temporais			
Número de entradas	15,5 ± 1,8	22,3 ± 2,6	t ₍₁₀₎ =3,474; p≤0,05
Tempo no local (s)	148,9 ± 19,2	389,3 ± 24,6	t ₍₁₀₎ =5,519; p≤0,05
Medidas de <i>grooming</i>			
Total de episódios	4,0 ± 0,9	9,3 ± 1,8	t ₍₁₀₎ =2,075; p>0,05
% de transições incorretas	80,6 ± 6,6	76,4 ± 5,5	t ₍₇₎ =0,814; p>0,05
Duração total de <i>grooming</i>	21,6 ± 11,6	47,9 ± 16,9	t ₍₁₀₎ =1,095; p>0,05
Freq. cadeias estereotipadas	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,6	t ₍₁₀₎ =1,309; p>0,05
Duração <i>grooming</i> rostral (s)	3,0 (0,0-5,4)	2,9 (1,6-13,2)	<i>Wilcoxon</i> ; p>0,05
Duração <i>grooming</i> caudal (s)	16,9 ± 9,4	40,8 ± 14,8	t ₍₁₀₎ =1,174; p>0,05

¹As medidas estão apresentadas como médias (±E.P.M.) ou medianas (I.I.Q.).

Concernente ao grupo Alta-Ansiedade (Tabela 4), o Teste *t* de *Student* apontou diferenças significativas das medidas espaço-temporais quanto ao seu compartimento de ocorrência, de forma que os animais efetuaram um maior número de entradas e despenderam mais tempo na toca em relação à superfície. Quanto às medidas de *grooming*, os animais também apresentaram maiores índices – total de episódios, duração total de *grooming*,

frequência de cadeias estereotipadas, duração de *grooming* rostral e de *grooming* caudal – quando estavam na toca, em comparação à superfície (para todos, *Wilcoxon*; $p \leq 0,05$). Apontase como exceção a porcentagem de transições incorretas, de modo que sua ocorrência não diferiu entre os compartimentos em estudo (*Wilcoxon*; $p > 0,05$).

Tabela 4.

Medidas¹ espaço-temporais e de *grooming* avaliadas em camundongos do grupo Alta-Ansiedade quanto ao seu local de ocorrência. Estudo 2.

Grupo Alta-Ansiedade	Toca	Superfície	Nível de significância
Medidas espaço-temporais			
Número de entradas	18,2 ± 1,6	10,7 ± 2,0	$t_{(10)}=2,749$; $p \leq 0,05$
Tempo no local (s)	380,7 ± 39,7	172,0 ± 32,9	$t_{(10)}=2,889$; $p \leq 0,05$
Medidas de <i>grooming</i>			
Total de episódios	11,0 (8,0-17,0)	0,0 (0,0-2,0)	<i>Wilcoxon</i> ; $p \leq 0,05$
% de transições incorretas	72,7 (66,7-78,2)	100 (78,1-100)	<i>Wilcoxon</i> ; $p > 0,05$
Duração total de <i>grooming</i>	142,7 (83,5-266,2)	0,0 (0,0-0,9)	<i>Wilcoxon</i> ; $p \leq 0,05$
Freq. cadeias estereotipadas	4,0 (3,0-6,0)	0,0 (0,0-0,0)	<i>Wilcoxon</i> ; $p \leq 0,05$
Dur. <i>grooming</i> rostral (s)	15,0 (11,5-26,3)	0,0 (0,0-0,1)	<i>Wilcoxon</i> ; $p \leq 0,05$
Dur. <i>grooming</i> caudal (s)	95,6 (46,6-167,8)	0,0 (0,0-0,9)	<i>Wilcoxon</i> ; $p \leq 0,05$

¹As medidas estão apresentadas como médias (\pm E.P.M.) ou medianas (I.I.Q.).

4.3 Estudo 3: Distância e direção defensivas

A Figura 8 apresenta as medidas de *grooming* avaliadas em camundongos do grupo Alta-Ansiedade, quando esses estavam na superfície e na toca (nesse último compartimento, houve a distinção entre quando o animal estava de costas ou de frente para a superfície). Referente ao total de episódios, duração total de *grooming*, frequência de cadeias estereotipadas e duração de *grooming* rostral e caudal, os animais exibiram maiores índices dessas medidas quando estavam na toca de frente para a superfície [Friedman, ($p \leq 0,05$); Dunn, “Superfície” vs. “Frente Superfície” ($p \leq 0,05$) e “Costas Superfície” vs. “Frente Superfície” ($p \leq 0,05$)]. A porcentagem de transições incorretas, por outro lado, foi maior quando os animais estavam na toca de costas para a superfície (Wilcoxon; $p \leq 0,05$).

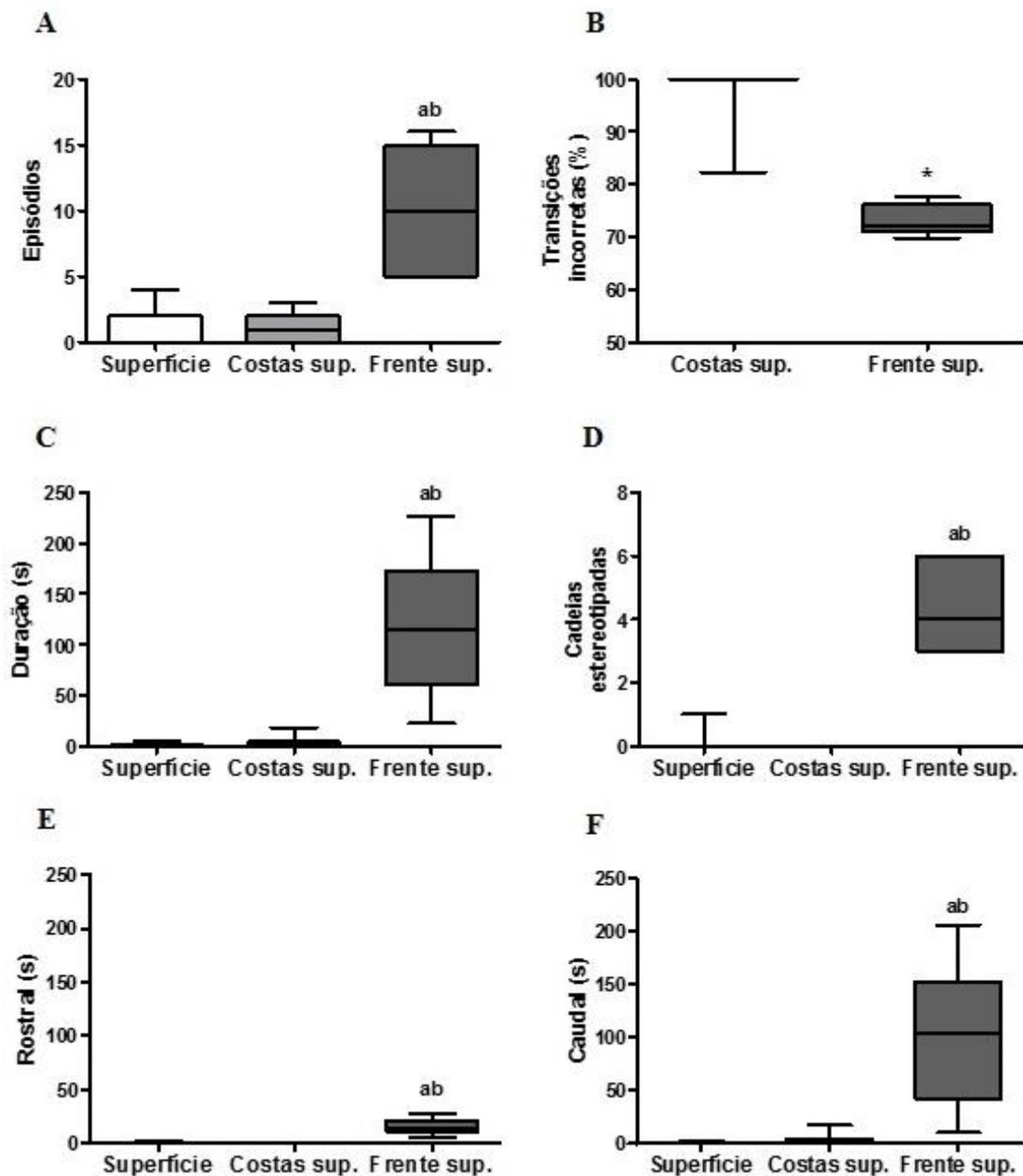


Figura 8. Medidas de *grooming* na superfície e na toca (de costas e de frente para a superfície) apresentadas por camundongos derrotados ($n=11$) que exibiram comportamentos que indicam maior ansiedade: (A) total de episódios, (B) porcentagem de transições incorretas (índices obtidos na toca; $n=7$), (C) duração total de *grooming*, (D) frequência de cadeias estereotipadas, (E) duração de *grooming* rostral e de (F) *grooming* caudal. Os dados estão representados pela mediana (I.I.Q.). Estudo 3.

ab, $p \leq 0,05$ em comparação à “Superfície” e “Costas Sup.” (Teste de *Friedman* e *post-hoc* de *Dunn*).

*, $p \leq 0,05$ em comparação à “Costas Sup.” (Teste de *Wilcoxon*).

5 Discussão

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar as relações entre *grooming* e ansiedade em camundongos reexpostos a um contexto onde ocorreu uma experiência de derrota social. Os resultados foram discutidos em subseções, de acordo com cada estudo realizado. Após a discussão dos resultados, apresenta-se uma discussão geral com os principais achados da pesquisa, suas limitações e perspectivas para pesquisas futuras que se proponham a investigar as relações entre *grooming* e ansiedade em contextos associados à derrota social.

5.1 Estudo 1: Grupo-Derrotado vs. Grupo-Não-Derrotado

Referente às medidas espaço-temporais, os camundongos do Grupo-Derrotado apresentaram maior latência para atingir a superfície do aparato experimental em relação ao Grupo-Não-Derrotado. Sustenta-se que a maior latência se deve à evitação decorrente do processo de condicionamento contextual aversivo, refletindo o estado de ansiedade dos animais derrotados. Tal leitura se pauta na análise da medida de latência em tarefas de esquiva passiva/inibitória, que também fazem uso do processo de condicionamento respondente – tarefas nas quais os animais mais ansiosos apresentam maior latência em explorar ambientes onde sofreram um choque elétrico (Cruz & Landeira-Fernandez, 2012; Tomaz, Silva, Batistão, & Castreghini, 2012).

No que diz respeito às medidas de *grooming*, a porcentagem de transições incorretas ocorridas na superfície foi maior no Grupo-Derrotado em comparação ao Grupo-Não-Derrotado. Entende-se que a alteração sequencial do *grooming* é indicativa de ansiedade entre os animais derrotados, dado que estudos prévios demonstraram tal alteração após a exposição a diferentes testes de ansiedade – e.g., Teste do labirinto em cruz elevado e Teste de transição claro-escuro (Kalueff & Tuohimaa, 2004; 2005b) – e sob efeito de diferentes fármacos: os

ansioênicos promovem a desorganização sequencial do *grooming*, ao passo que os ansiolíticos promovem a sua reorganização (Kalueff & Tuohimaa, 2005a).

As demais medidas avaliadas na presente pesquisa, tanto as espaço-temporais – frequência de entradas na toca, túnel e superfície e tempo despendido nesses três compartimentos – como as medidas de *grooming* – total de episódios, frequência de cadeias estereotipadas, duração total e duração de *grooming* rostral e caudal –, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Tais medidas não serviriam, portanto, para discriminar camundongos derrotados submetidos à reexposição ao contexto de derrota social de camundongos não-derrotados.

Os resultados acima descritos divergem daqueles obtidos por Crestani et al. (2018) em dois aspectos: no referido estudo, os camundongos derrotados passaram mais tempo na toca e realizaram mais *grooming* nesse compartimento (duração total). Tais divergências podem se dever ao uso de um menor número de animais no presente estudo, o que também configura uma de suas limitações. O propósito da pesquisa de Crestani et al. (2018) foi investigar o perfil comportamental de camundongos derrotados e não-derrotados por meio de análises fatoriais, o que requer amostras consideravelmente grandes. Outro possível fator de discrepância é o fato do *grooming* ter sido avaliado de maneiras distintas entre os estudos. Cabe ressaltar que, no estudo de Kalueff e Tuohimaa (2004) que avaliou tanto a duração total de *grooming* como a porcentagem de transições incorretas, ambas aumentaram cinco minutos após a exposição ao estressor de derrota social, o que coaduna com os resultados de Crestani et al. (2018) e com os da presente pesquisa, respectivamente.

Apesar de ocorrerem em diferentes compartimentos, sugere-se, a partir da discussão prévia, que as medidas de *grooming* que apresentaram um aumento significativo – duração total de *grooming* no estudo de Crestani et al. (2018) e porcentagem de transições incorretas na

presente pesquisa – são informativas do estado de ansiedade dos animais do Grupo-Derrotado frente à reexposição ao contexto associado à derrota social.

5.2 Estudo 2: Alta-Ansiedade vs. Baixa-Ansiedade

Para o Estudo 2, os animais do Grupo-Derrotado foram divididos entre dois grupos com perfis ansiosos distintos, tendo como critério a baixa (grupo Baixa-Ansiedade) e alta (grupo Alta-Ansiedade) frequência do comportamento de SAP – medida considerada representativa do estado de ansiedade em roedores (Blanchard et al., 1991; Blanchard et al., 2001). Foram efetuadas, então, comparações intra e intergrupos no que se refere às medidas espaço-temporais e de *grooming*.

A partir da divisão dos grupos, constatou-se que os animais de cada grupo apresentaram diferentes níveis de responsividade ao procedimento realizado e estratégias de *coping* distintas – isto é, respostas comportamentais apresentadas em situações aversivas, cujo efeito consiste na cessação de tais situações ou na redução do estresse fisiológico por elas produzido (Wechsler, 1995).

Em estudos prévios, ratos cruzados seletivamente de acordo com as características de rápida (*Roman High-Avoidance* – RHA) e baixa aprendizagem (*Roman Low-Avoidance* – RLA) de respostas de esquiva ativa de duas vias no Teste da *shuttle-box* (e.g., Bignami, 1965) apresentaram diferentes índices de respostas comportamentais e neuroendócrinas (e.g., defecação, congelamento e corticosterona) quando submetidos a diferentes procedimentos aversivos, como a exposição à novidade, o Teste do medo condicionado e o Teste do campo aberto (Driscoll et al., 1998; Steimer & Driscoll, 2003). Os animais RLA tendem a apresentar maiores índices dessas medidas, sendo, portanto, considerados mais ansiosos. Adicionalmente, admite-se que as diferenças comportamentais entre os grupos refletem estratégias de *coping* distintas frente a contextos aversivos (Steimer & Driscoll, 2003; Steimer, La Fleur, & Schulz, 1997).

Embora tradicionalmente os animais RLA também apresentem maiores índices de *grooming* (Escorihuela et al., 1999; Ferré et al., 1995), a maior ou menor ocorrência desse comportamento parece variar com o contexto. No Teste do campo aberto e no Teste da placa perfurada, por exemplo, os animais RLA efetuaram maiores índices de medidas de *grooming* (e.g., duração total e porcentagem de transições incorretas), ao passo que os RHA efetuaram menores índices. Já no Teste de esquiva ativa na *shuttle-box*, um procedimento que pode ser considerado mais aversivo devido à administração de choques elétricos, os animais RHA efetuaram maiores índices de *grooming* (e.g., total de episódios e duração total) quando comparados aos animais RLA. Os grupos não difeririam entre si quando avaliados em uma gaiola-viveiro (Estanislau et al., 2013).

Tal como os animais RHA e RLA, os animais Baixa e Alta-Ansiedade do presente estudo também apresentaram diferentes estratégias de *coping* e variações do *grooming* de acordo com o contexto. Assim como os RHA, os animais do grupo Baixa-Ansiedade parecem demonstrar uma estratégia de *coping* que definimos como “ativo”. Isso se reflete nas medidas espaço temporais e de *grooming*: maior número de entradas e tempo despendido na superfície (comparações intra e intergrupos), bem como uma tendência de menor latência para chegar nesse local. Referente ao *grooming*, a comparação intergrupos apontou que o grupo Baixa-Ansiedade exibiu maiores índices na superfície, excetuando-se a porcentagem de transições incorretas. Ressalta-se, no entanto, que a comparação intragrupo demonstrou que o *grooming* ocorreu indiscriminadamente em todo o aparato – um possível indicativo de que nenhum dos compartimentos foi particularmente aversivo aos animais desse grupo.

Já os animais do grupo Alta-Ansiedade, assim como os RLA, apresentaram comportamentos que indicariam estratégias de *coping* que definimos como “passivo”. Novamente, isso se reflete nas medidas espaço temporais e de *grooming*: menor número de entradas e tempo na superfície do aparato, além de maior tempo na toca (comparação

intergrupos) e maior número de entradas nesse local (comparação intragrupo). Relativo ao *grooming*, tanto na comparação intra como na intergrupos os índices mostraram-se maiores na toca, excetuando-se a porcentagem de transições incorretas. Somadas, essas informações podem indicar que os animais do grupo Alta-Ansiedade foram mais responsivos ao procedimento aversivo realizado.

Uma vez que os animais do grupo Baixa e Alta-Ansiedade passaram por um estressor prévio de derrota social, seguido da reexposição ao contexto a ele associado, sugere-se que o *grooming* observado nesses animais pode ter função de *dearousal* frente ao ambiente potencialmente aversivo (Spruijt et al., 1992; van Erp et al., 1994). Ressalta-se que essa função foi exercida em diferentes contextos, a depender do nível de responsividade do grupo: na toca pelo grupo Alta-Ansiedade e indiscriminadamente nos compartimentos do aparato pelo grupo Baixa-Ansiedade.

5.3 Estudo 3: Distância e direção defensivas

No Estudo 3, os camundongos derrotados que compuseram o grupo Alta-Ansiedade apresentaram maiores índices das medidas de *grooming* (i.e., total de episódios, duração total, frequência de cadeias estereotipadas e duração de *grooming* rostral e caudal) quando estavam na toca de frente para a superfície. Excetua-se a porcentagem de transições incorretas, que foi maior quando os animais estavam na toca de costas para a superfície.

Considerando o parâmetro “distância defensiva”, o *grooming* ocorreu no local mais distante (toca) da superfície onde se deu a derrota social, tal como nos estudos de Crestani et al. (2018) e Gil (2018), embora esses tenham utilizado diferentes grupos de comparação: derrotado vs. não-derrotado. Entende-se que tal fato se deve ao *grooming* não ser um comportamento defensivo e de alta prioridade em situações de risco (Estanislau, 2012; Spruijt et al., 1992). Portanto, na medida em que o animal se aproxima da superfície, esperar-se-ia observar comportamentos defensivos, como o SAP, que permitiriam que o camundongo

avaliasse o risco potencial do ambiente. A literatura a respeito do Teste de Exposição ao Rato (RET), cujo aparato e procedimento foram adaptados para o presente estudo, corrobora a afirmativa anterior, visto que nesse teste o SAP ocorre predominantemente no túnel (Amaral, Gomes, & Nunes-de-Souza, 2010; Yang et al., 2004).

Já em relação ao parâmetro “direção defensiva”, a ocorrência de *grooming* com o camundongo voltado à fonte da ameaça potencial (superfície) poderia apontar, de acordo com a hipótese de Gray e McNaughton (2000), para um estado de ansiedade do animal. De acordo com os autores, a ansiedade ocorre quando os animais se aproximam da fonte da ameaça potencial, presumindo-se, portanto, que esses estão voltados a tal fonte. A ocorrência do *grooming* no espaço protegido da toca, tal como discutido em relação ao Estudo 2, sugere que os animais estão em *dearousal* (Spruijt et al., 1992; van Erp et al., 1994), ao mesmo tempo que se mantêm vigilantes – indicando, desse modo, um estado de ansiedade intermediário.

No que se refere à porcentagem de transições incorretas, essa medida foi discrepante devido aos maiores índices observados nos animais quando estavam de costas para a superfície e não de frente para ela, como nas demais medidas. A hipótese para tal discrepância seria a de que o *dearousal* ocorre com o animal voltado à fonte da ameaça potencial, estando, portanto, em um estado de ansiedade reduzido – o que se refletiu em uma menor porcentagem de transições incorretas – em relação a quando o animal está de costas para a ameaça.

6 Discussão geral

Nos últimos anos, alguns autores têm apontado que diferentes medidas de *grooming* podem ser informativas sobre o estado de ansiedade em roedores (e.g., Estanislau, 2012; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Kalueff et al., 2016). A partir dos resultados do presente estudo, demonstrou-se que alterações específicas nas medidas de *grooming* são também informativas sobre o estado de ansiedade de determinados grupos de animais no procedimento de reexposição ao contexto associado à derrota social.

A porcentagem de transições incorretas foi a medida menos consistente entre os estudos. Dado que os animais derrotados (Estudo 1) apresentaram maiores índices dessa medida na superfície (ambiente mais ansiogênico), esperar-se-ia que esses índices também fossem maiores na superfície entre os animais do grupo Alta-Ansiedade (Estudo 2), algo que não foi observado nas comparações intra e intergrupos. Essas discrepâncias podem se dever ao fato de que, na avaliação da porcentagem de transições incorretas em comparações intra e intergrupos do Estudo 2, utilizou-se um baixo número amostral: somente cinco animais do grupo Alta-Ansiedade compuseram a amostra, pois foram os únicos que realizaram *grooming* na superfície do aparato. Tal limitação parece ter dificultado a observação de possíveis diferenças estatisticamente significativas.

O uso dos critérios de alta e baixa frequência de SAP mostrou-se útil para a distinção de animais com diferentes níveis de responsividade ao procedimento realizado e estratégias de *coping* distintas (i.e., ativas e passivas), o que inclui o próprio *grooming*. Além disso, esse comportamento parece ocorrer em diferentes contextos, a depender de características prévias dos animais. Tais dados indicam que o *grooming* parece participar das estratégias de *coping* exercidas por roedores diante de situações potencialmente ameaçadoras.

O presente estudo teve como diferencial a avaliação da ocorrência de *grooming* quanto aos parâmetros distância e direção defensivas. Destaca-se que, em animais que apresentaram

características que indicam maior responsividade ao procedimento realizado (grupo Alta-Ansiedade), as medidas de *grooming* ocorreram no local mais distante (toca) em relação à fonte de ameaça potencial (superfície) e com os animais predominantemente direcionados para tal fonte, o que aponta para um estado de ansiedade e vigilância. Esses resultados evidenciam, portanto, que o *grooming* pode ser modulado pelos fatores “distância” e “direção defensivas” em contextos de ameaça potencial.

As diferentes medidas de *grooming* observadas nos Estudos 2 e 3 parecem refletir a função de *dearousal* frente à reexposição ao ambiente associado à derrota social, o que coaduna com a literatura acerca da função do *grooming* em diferentes procedimentos aversivos (e.g., Estanislau et al., 2013; Komorowska & Pisula, 2003; Veloso et al., 2016). Os achados também demonstram que tal função foi exercida em diferentes compartimentos, a depender do nível de responsividade dos animais.

Por fim, de modo a investigar as possíveis funções das medidas de *grooming* entre os animais derrotados e não-derrotados, bem como nos animais dos grupos Alta e Baixa-ansiedade, seriam relevantes novos estudos que avaliassem os efeitos de agentes farmacológicos ansiolíticos e ansiogênicos nesse procedimento. Do mesmo modo, seria importante efetuar-se alterações procedimentais que permitam melhor exploração das medidas avaliadas nesse estudo, tais como os efeitos de um maior número de derrotas sociais ou do acréscimo de pistas olfativas do coespecífico agressivo na fase de reexposição. Finalmente, dado o efeito diferencial que o procedimento produziu sobre os comportamentos dos animais dos grupos Baixa e Alta-Ansiedade, seria interessante avaliar, de forma exploratória, os efeitos desse procedimento nos animais RLA e RHA, observando assim, se esses exerceriam estratégias de *coping* análogas às dos animais do presente estudo.

Referências Bibliográficas

- Amaral, V. C. S., Gomes, K. S., & Nunes-de-Souza, R. L. (2010). Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. *Hormones and Behavior*, *57*(2), 128-133. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.09.018
- American Psychiatric Association. (2014). *DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais*. Porto Alegre: Artmed.
- Baldwin, D. S., Anderson, I. M., Nutt, D. J., Bandelow, B., Bond, A., Davidson, J. R., ... & Wittchen, H. U. (2005). Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, *19*(6), 567-596. doi: 10.1177/0269881105059253
- Bartolomucci, A., Fuchs, E., Koolhaas, J. M., & Ohl, F. (2009). Acute and chronic social defeat: stress protocols and behavioral testing. In T. D. Gould (Ed.), *Mood and anxiety related phenotypes in mice* (pp. 261-275). Totowa, NJ: Humana Press.
- Berridge, K. C. (1990). Comparative fine structure of action: rules of form and sequence in the grooming patterns of six rodent species. *Behaviour*, *113*(1), 21-56. doi: 10.1163/156853990X00428
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC biology*, *3*(4), 1-16. doi: 10.1186/1741-7007-3-4
- Berridge, K. C., Fentress, J. C., & Parr, H. (1987). Natural syntax rules control action sequence of rats. *Behavioural brain research*, *23*(1), 59-68. doi: 10.1016/0166-4328(87)90242-7
- Bignami, G. (1965). Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in the rat. *Animal behaviour*, *13*(2-3), 221-227. doi: 10.1016/0003-3472(65)90038-2
- Blanchard, D. C. (1997). Stimulus, environmental, and pharmacological control of defensive behaviors. In M. E. Bouton & M. Fanselow (Eds.), *The functional behaviorism of Robert C. Bolles: learning, motivation and cognition* (pp. 283-305). Washington, DC: American Psychological Association.
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual review of psychology*, *39*(1), 43-68. doi: 10.1146/annurev.ps.39.020188.000355
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors, fear, and anxiety. In R. J. Blanchard, D. C. Blanchard, G. Griebel & D. Nutt (Eds.), *Handbook of Anxiety and Fear* (pp.63-81). New York, NY: Elsevier.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Rodgers, R. J. (1991). Risk assessment and animal models of anxiety. In B. Oliver, J. Mos & J. L. Slangen (Eds.), *Animal models in psychopharmacology* (pp. 117-134). Basel: Birkhäuser.

- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 205-218. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00009-4
- Bolles, R. C. (1960). Grooming behavior in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 53(3), 306-310. doi: 10.1037/h0045421
- Brasil (2011, julho/dezembro). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC*, (2)1-9.
- Chaim, K. T., & Morato, S. (2005). Software X-Plo-Rat, Versão 1.1.0.c.
- Crestani, A. M., Cipriano, A. C., & Nunes-de-Souza, R. L. (2018). Single aggressive and non-aggressive social interactions elicit distinct behavioral patterns to the context in mice. *Behavioural processes*.
- Cruz, A. D. M., & Landeira-Fernandez, E. (2012). Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In J. Landeira-Fernandez & S. F. Fukusima (Eds.), *Métodos em Neurociência* (pp. 192-217). Barueri, SP: Manole Conteúdo.
- de Carvalho-Netto, E. F. (2009). Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, 54(2), 62-65. Recuperado de http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos_medicos/2009/54_2/vlm54n2_5.pdf
- Denmark, A., Tien, D., Wong, K., Chung, A., Cachat, J., Goodspeed, J., ... & Bartels, B. (2010). The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. *Behavioural brain research*, 208(2), 553-559. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.041
- Driscoll, P., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Giorgi, O., Schwegler, H., Steimer, T., ... & Langhans, W. (1998). Genetic selection and differential stress responses: the Roman lines/strains of rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 501-510. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09029.x
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Gil, L., Aguilar, R., Tobena, A., & Driscoll, P. (1999). Inbred Roman high-and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiology & Behavior*, 67(1), 19-26. doi: 10.1016/S0031-9384(99)00064-5
- Estanislau, C. R. (2012). Cues to the usefulness of grooming behavior in the evaluation of anxiety in the elevated plus-maze. *Psychology & Neuroscience*, 5(1), 105-112. doi: 10.3922/j.psns.2012.1.14
- Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A., & Fernández-Teruel, A. (2013). Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high-and low-avoidance rats. *Neuroscience research*, 77(4), 187-201. doi: 10.1016/j.neures.2013.09.012
- Fernández-Teruel, A., & Estanislau, C. (2016). Meanings of self-grooming depend on an inverted U-shaped function with aversiveness. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(9), 591-592. doi: 10.1038/nrn.2016.102

- Ferré, P., Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R. M., Driscoll, P., Corda, M. G., Giorgi, O., & Tobena, A. (1995). Behavior of the Roman/Verh high-and low-avoidance rat lines in anxiety tests: relationship with defecation and self-grooming. *Physiology & behavior*, 58(6), 1209-1213. doi: 10.1016/0031-9384(95)02068-3
- Geyer, M. A., & Markou, A. (1995). Animal models of psychiatric disorders. In F. E. Bloom & D. J. Kupfer (Eds.), *Psychopharmacology: the fourth generation of progress* (pp. 787-798). New York, NY: Raven Press.
- Gil, J. M. P. (2018). *Avaliação comportamental de camundongos expostos ao teste de aversão condicionada ao contexto induzida pela interação social agressiva* (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, Brasil.
- Graeff, F. G. (2012). Medicamentos ansiolíticos. In F. G. Graeff & F. S. Guimarães (Eds.), *Fundamentos de Psicofarmacologia* (2ª ed., pp.165-183). São Paulo, SP: Atheneu.
- Graeff, F. G. (2014). Transtorno de Ansiedade. In F. G. Graeff & M. L. Brandão (Eds.), *Neurobiologia dos Transtornos Mentais* (pp. 131-163). São Paulo, SP: Atheneu.
- Gray, J. A., & McNaughton, N. (2000). The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system (2ª ed.). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151-158. doi: 10.1016/j.brainresprot.2004.04.002
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005a). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European journal of pharmacology*, 508(1-3), 147-153.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005b). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of neuroscience methods*, 143(2), 169-177. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45-59. doi: 10.1038/nrn.2015.8
- Komorowska, J., & Pellis, S. M. (2004). Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behavioural processes*, 67(2), 287-293. doi: 10.1016/j.beproc.2004.05.001
- Komorowska, J., & Pisula, W. (2003). Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behavior in rats?. *International journal of comparative psychology*, 16(4).
- Maio, T. P., Filgueiras, G. B., Cunha, D. C., & Estanislau, C. (2014). Animal models of obsessive-compulsive disorder: strain differences. *World Journal of Neuroscience*, 4(03), 240-246. doi: 10.4236/wjns.2014.43027

- Martinez, M., Calvo-Torrent, A., & Pico-Alfonso, M. A. (1998). Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. *Aggressive Behavior*, 24(4), 241-256. doi: 10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4<241::AID-AB1>3.0.CO;2-M
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285-305. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.005
- Nutt, D. J. (1990). The pharmacology of human anxiety. *Pharmacology & therapeutics*, 47(2), 233-266. doi: 10.1016/0163-7258(90)90089-K
- Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H., & Le Moal, M. (1986). Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiology & behavior*, 36(2), 223-228. doi: 10.1016/0031-9384(86)90007-7
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian journal of medical and biological research*, 30, 289-304. doi: 10.1590/s0100-879x1997000300002
- Society of Clinical Psychology, Division 12 of the APA. (2016). Recuperado de <https://www.div12.org/>
- Spruijt, B. V., Van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological reviews*, 72(3), 825-852. doi: 10.1152/physrev.1992.72.3.825
- Steimer, T., & Driscoll, P. (2003). Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress*, 6(2), 87-100. doi: 10.1080/1025389031000111320
- Steimer, T., La Fleur, S., & Schulz, P. E. (1997). Neuroendocrine correlates of emotional reactivity and coping in male rats from the Roman high (RHA/Verh)-and low (RLA/Verh)-avoidance lines. *Behavior genetics*, 27(6), 503-512.
- Tomaz, C., da Silva, S. L., Batistão, O., & Castreghini, J. (2012). Um aparelho simples para medir três tipos diferentes de esquiva inibitória. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 3(1), 64-71.
- Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (1993). Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology & behavior*, 53(5), 983-993. doi: 10.1016/0031-9384(93)90278-N
- 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(1), 47-55. doi: 10.1016/0166-4328(94)90072-8

- Veloso, A. W. N., Filgueiras, G. B., Lorenzo, P., & Estanislau, C. (2016). Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychology & Neuroscience*, 9(1), 91-104. doi: 10.1037/pne0000038
- Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Brown, A., ... & Coggeshall, M. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1545-1602. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
- Wechsler, B. (1995). Coping and coping strategies: a behavioural view. *Applied Animal Behaviour Science*, 43(2), 123-134. doi: 10.1016/0168-1591(95)00557-9
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1), 1-16. doi: 10.1007/BF00427414
- Yang, M., Augustsson, H., Markham, C. M., Hubbard, D. T., Webster, D., Wall, P. M., ... & Blanchard, D. C. (2004). The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & behavior*, 81(3), 465-473. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.010

Apêndice

Distribuição dos animais derrotados nos grupos Alta-Ansiedade e Baixa-Ansiedade. Estudo 2.

Grupo Alta-Ansiedade (n=11)		Grupo Baixa-Ansiedade (n=11)	
Frequência de SAP	Tempo na superfície (s)	Frequência de SAP	Tempo na superfície (s)
9	304,579	0	530,049
8	236,862	0	502,39
7	4,75	0	429,874
7	102,917	0	422,369
6	61,459	0	390,471
6	114,882	0	377,351
5	58,112	0	376,012
5	290,768	0	361,856
4	173,142	0	358,853
4	242,042	0	342,545
4	311,183	0	340,225