

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DO REFÚGIO NA
MEDIÇÃO DAS RESPOSTAS EMOCIONAIS DE ANSIEDADE NO
CAMPO ABERTO

Bolsista: Vívian Ferreira Mendonça, CNPq

MANAUS

2013

UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DO REFÚGIO NA
MEDIAÇÃO DAS RESPOSTAS EMOCIONAIS DE ANSIEDADE NO
CAMPO ABERTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-SA/0005/2012

UM ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DO REFÚGIO NA
MEDIÇÃO DAS RESPOSTAS EMOCIONAIS DE ANSIEDADE NO
CAMPO ABERTO

Bolsista: Vívian Ferreira Mendonça, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Walter Adriano Ubiali

MANAUS

2013

RESUMO

O interesse nos estudos experimentais em animais que possibilitem a compreensão de processos humanos básicos aumentou significativamente nos últimos anos, sobretudo como avanço das neurociências que relacionam de modo mais peremptório a neurofisiologia animal e o comportamento humano. A análise experimental de fenômenos cognitivos e emocionais em animais não humanos envolve investigações com pesquisas básicas em Psicologia, abrindo campo para o desenvolvimento de propostas em pesquisas aplicadas, uma vez que há um crescente aumento no interesse e na compreensão destes aspectos em animais humanos. O presente estudo tem como objetivo investigar o efeito da utilização do refúgio na mediação das respostas de ansiedade do rato Wistar no campo aberto. Para isso serão utilizados 96 sujeitos experimentais jovens (90-120 dias), que serão expostos numa arena (Campo Aberto) em quatro sessões. A primeira e última sessão serão para mensuração pré e pós intervenção. Na segunda e na terceira sessão serão adicionados no centro do Campo Aberto um refúgio, onde o animal poderá se abrigar. Foi observado o efeito do refúgio na modulação das respostas emocionais de ansiedade no comportamento dos animais na última sessão, comparando-se com a primeira, demonstrando que processos cognitivos são imensamente úteis, para regulação das respostas emocionais também em animais. Houve um aumento estatisticamente significativo do repouso no grupo controle e manteve-se baixa na média da frequência do grupo refúgio. Houve uma diminuição nos níveis de ansiedade no grupo refúgio.

Palavras-Chave: Modelos animais; Ansiedade; Refúgio; Campo Aberto

ABSTRACT

Animal models are commonly used to evaluate various ethological patterns of behavior, as they provide meaningful information on proposed intervention. Experimental studies in the are made in order to develop hypotheses recognized in scientific circles from research such as this, which aims to identify behavioral patterns of anxiety in Wistar rat, before the introduction of the new element (refuge) in an unknown environment for him (open field). The data collections were made at the Laboratory of Experimental Psychology, Neuroscience and Behavior - LAPENEC, School of Psychology / UFAM, this work is a sub-project of a Master research entitled "The Effect of Learning in Mediation of Anxiety Emotional Responses Wistar Rat ".

Key Words: Animals Models; Anxiety; Refuge; Open Field

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3. METODOLOGIA.....	15
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	35
REFERENCIAS.....	36
ANEXO.....	40

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, grandes pensadores, principalmente filósofos, discutiam a relação entre “animais humanos” e “não humanos”. Aristóteles (384-322 a.C.) já realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais, constatando semelhanças e diferenças de conformação e funcionamento. A primeira pesquisa científica que utilizou animais sistematicamente talvez tenha sido a realizada por William Harvey, publicada em 1638, sob o título *Exercitatio anatómica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Nesse livro, o autor apresentou os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação realizados em mais de 80 diferentes espécies animais.

Modelos animais constituem estudos experimentais mais amplamente utilizados para a análise de fenômenos comportamentais, neurobiológicos e fisiológicos. Embora a pesquisa com animais possa incluir estudos com primatas, peixes, felinos, cães, aves e outras espécies, o rato sido o animal preferido nas pesquisas há mais de um século. No entanto modelos animais são estudados pela perspectiva teórica aplicada sobre a investigação. (McNAUGHTON and ZANGROSSI, 2008).

Segundo Vasques (2008) o campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934) para o estudo da emoção em ratos, normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como os movimentos locomotores que são os deslocamentos entre um ponto a outro da arena, os movimentos de exploração ou não locomotores que são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento como, por exemplo, elevação vertical, cheirar o ambiente e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para compreender o efeito de diferentes drogas psicoestimulantes e ansiolíticas. (PRUT & BELZUUNG, 2003; EILAM, 2003).

O interesse nos estudos experimentais em animais que possibilitem a compreensão de processos humanos básicos aumentou significativamente nos últimos anos, sobretudo como avanço das neurociências que relacionam de modo mais peremptório a neurofisiologia animal e o comportamento humano. A análise experimental de fenômenos cognitivos e emocionais em animais não humanos envolvem investigações com pesquisas básicas em Psicologia, abrindo campo para o desenvolvimento de propostas em pesquisas aplicadas, uma vez que há um crescente aumento no interesse e na compreensão destes aspectos em animais humanos.

As hipóteses para esse estudo são:

H0: não haverá alteração nos níveis de ansiedade com a introdução do refúgio (Toca da Mamed) no campo aberto (open field);

H1: haverá alteração nos níveis de ansiedade com a introdução do refúgio (Toca da Mamed) no campo aberto (open field);

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento - LAPENEC, da Faculdade de Psicologia/UFAM, sendo sub-projeto de uma pesquisa de Mestrado intitulada “**O Efeito da Aprendizagem na Mediação das Respostas Emocionais de Ansiedade no Rato Wistar**”.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

1. Emoções em animais

Desde a antiguidade, grandes pensadores, principalmente filósofos, discutiam a relação entre “animais humanos” e “não humanos”. Aristóteles (384-322 a.C.) já realizou estudos comparativos entre órgãos humanos e de animais, constatando semelhanças e diferenças de conformação e funcionamento. A primeira pesquisa científica que utilizou animais sistematicamente talvez tenha sido a realizada por William Harvey, publicada em 1638, sob o título *Exercitatio anatómica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Nesse livro, o autor apresentou os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação realizados em mais de 80 diferentes espécies animais.

Modelos animais constituem estudos experimentais mais amplamente utilizados para a análise de fenômenos comportamentais, neurobiológicos e fisiológicos. Embora a pesquisa com animais possa incluir estudos com primatas, peixes, felinos, cães, aves e outras espécies, o rato sido o animal preferido nas pesquisas há mais de um século. No entanto modelos animais são estudados pela perspectiva teórica aplicada sobre a investigação. (McNAUGHTON & ZANGROSSI, 2008).

É comum, quando se fala em emoção em animais, certo receio, por acreditar-se comumente que estes conceitos implicam estados subjetivos exclusivos em humanos (LEDOUX, 1994, 1996). Ainda é importante ressaltar que: praticar ato de abuso e crueldade; manter animais em locais anti-higiênicos, ou que lhes impeçam a respiração, movimentos e descanso ou os privem de ar e luz; abandonar animal doente ou ferido, extenuado ou mutilado, bem como deixar de ministrar a ele tudo o que humanitariamente se lhe possa prover; não dar morte rápida, livre de sofrimento prolongado a todo animal cujo extermínio

seja necessário para consumo ou não; e encerrar os animais em número tal que não lhes seja possível mover-se livremente ou deixá-los sem água ou comida, são caracterizados atos de maus-tratos aos animais (BAEDER, 2012).

As investigações sobre as emoções em modelos animais consideram abordagens fisiológicas, comportamentais e neurobiológicas.

1.1 Medo e Ansiedade

Medo e ansiedade são as reações complexas. A variedade de formas em que podem ser inadequadas reflete essa complexidade. Além para ser demasiado intensa ou demasiado persistente, que pode ser provocada por estímulos incorretos, isto é, aqueles que não são verdadeiramente ameaçadores. Por sua vez, as qualidades ameaçam de um determinado estímulo pode depender de muitos fatores, incluindo inata ou tendências pré-programados, a aprendizagem específica pela experiência direta ou por observação das experiências dos outros, estressores inespecíficos últimos ou presente, etc. Essa multiplicidade de fatores que contribuem para as qualidades de estímulos ameaçadores que provocam o medo e ansiedade levou para paralelo variação dos estímulos utilizados como modelos de ansiedade.

Segundo Blanchard e Blanchard (2008) as respostas emocionais de medo e ansiedade podem ser compreendidas, respectivamente, como resultado de comportamentos adaptados e mal adaptados aos estímulos ambientais. Essa distinção nominal visa distinguir termos que durante muito tempo foram tratados como semelhantes, uma vez que historicamente o termo medo surgiu pela primeira vez como indicativo emocional de responsividade ao perigo no século XIII e a ansiedade apenas no século XVI, correlacionando as duas palavras para designar o mesmo padrão comportamental.

A distinção entre o medo e ansiedade pode ser assim compreendida: a ansiedade caracteriza-se como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e

de possível ocorrência. O medo, no entanto, define-se como uma reação a uma situação perigosa real, clara, evidente. Muitos autores estabelecem o medo como entidade independente da ansiedade, entretanto, algumas vezes pode ser difícil a separação entre uma e outra (RAMOS *et al.*, 1997).

Pesquisas em modelos animais são comumente utilizadas em laboratórios para desenvolver estudos sobre ansiedade. Estas pesquisas incluem uma diversidade de investigações que podem variar desde testes pré-clínicos de compostos ansiolíticos, até o mapeamento de substratos neurais que participam das reações de defesa diante de estímulos que representam perigo e/ou ameaça. (FLINT, 2003). O desenvolvimento dos modelos animais recebeu impulso importante pela compreensão da neurobiologia da ansiedade (LACERDA, 2006).

A maioria dos modelos de ansiedade envolve algum tipo de estimulação aversiva. A aversão é basicamente induzida por estímulos nociceptivos ou outras formas de desconforto, incluindo a exposição animal a ambientes novos ou potencialmente perigosos, predadores ou estímulos associados a estes, ou ainda, pelo confronto ou ataque com animais da mesma espécie. Existem mais modelos animais de ansiedade do que qualquer outra condição psiquiátrica (GRAEFF *et al.*, 1997).

Estudos sobre a ansiedade revelam ainda que ela tem suas raízes nas reações de medo dos animais. Estas investigações revelam também, que os substratos neurais das reações inatas de medo parecem estar mais diretamente relacionados aos mecanismos de ansiedade do que estariam aqueles envolvidos em formas complexas de aprendizagem associativa (GRAEFF *et al.*, 1997).

Alguns modelos experimentais com animais sugerem que as emoções automáticas e não conscientes, apresentam influência determinante nos processos cognitivos (LITVIN, PENTKOWSKI, POBBE, BLANCHARD & BLANCHARD, 2008). Seus efeitos na

modulação da emoção sobre as funções cognitivas tais como aquisição e consolidação de memórias (MORMÈDE & RAMOS, 1998).

Diversas pesquisas evidenciam que estados afetivos modulam a atenção, a memória e os julgamentos dos animais. Contudo tais pesquisas necessitam de maior aprofundamento para alicerçar uma proposta teórica mais consistente diante dos inúmeros modelos experimentais existentes. Entretanto, estudos iniciais já revelam o potencial que tais pesquisas possuem para consolidar um modelo experimental padrão para investigar estados emocionais em animais (FANSELOW & PONNUSAMY, 2008).

1.2 Bases Neurofisiológicas

As emoções em animais são comumente estudadas medindo diversos aspectos fisiológicos como: o eixo hipotálamo adrenal (níveis de ACTH, dexametasona, entre outros), alterações simpáticas e autonômicas (frequência cardíaca, pressão arterial, entre outros) e/ou níveis de substratos neuroendócrinos (oxitocina, vasopressina, prolactina, etc) (BRADLEY & LANG, 2000). Associado a estes aspectos as observações comportamentais ajudam a interpretar os estados emocionais (PAUL, HARDING, MENDL, 2005).

Zangrossi e McNaughton (2008) asseveram que as ocorrências de emoções em ratos correspondem a componentes autonômicos e comportamentais que podem se estudados dissociadamente em estudos experimentais. Medidas fisiológicas da emoção costumam ser associadas a estudos sobre o estresse. Pesquisadores interessados em estudar estados emocionais costumam utilizar as mudanças na fisiologia do estresse como indicador de estados emocionais. Estes modelos envolvem a observação de respostas a situações susceptíveis a estímulos aversivos que por sua vez, produzem estados emocionais negativos, favorecendo o uso do termo “ansiedade” e “frustração” para rotular estados emocionais

associados a medidas comportamentais e fisiológicas de estresse (RAMOS & MORMEDE, 1998; ELDER & MENZEL, 2001).

Esta sobreposição fica evidente nos estudos sobre medo e ansiedade, na qual o substrato neurofisiológico destes estados emocionais (amígdala e sistemas associados) tem efeito claro sobre o sistema neuroendócrino do estresse (eixo hipotálamo – pituitária – adrenal) e sistema simpático – adrenal – medular (SAM) (LE DEOUX, 1996). Estes dois fenômenos podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, sugerindo a existência de mecanismos neurais comuns em ambos estados emocionais (GRAEFF *et al*, 1993).

2. Comportamentos Naturais

2.1 Habituação

Habituação é um fenômeno do comportamento que ocorre entre as espécies de animais, indo de pequenos seres vivos a formas mais complexas como o ser humano. Segundo Takechi (1995), como em outros fenômenos comportamentais, supõe-se que as semelhanças entre os processos nas diversas espécies animais permitiriam agrupar tais fenômenos de decremento sob o mesmo rótulo geral de habituação; nesse caso, quanto mais detalhadas forem as semelhanças, maior é a probabilidade de estarmos falando do mesmo fenômeno. Porém, na literatura atual há problemas de definição entre os estudiosos.

Thompson & Spencer (1966) chegaram a nove características para definir a habituação:

1. Dado que um particular estímulo elicia uma resposta, a aplicação repetida do estímulo resulta numa diminuição de resposta (habituação). A

diminuição é, em geral, uma função exponencial negativa do número de apresentações do estímulo;

2. Se o estímulo for retirado, a resposta tende a se recuperar com o tempo (recuperação espontânea);

3. Se forem fornecidas repetidas séries de treino em habituação a recuperação espontânea, a habituação se torna cada vez mais rápida (potenciação de habituação);

4. Mantendo-se outras condições constantes, quanto mais rápida for a frequência do estímulo, mais rápida e/ou mais pronunciada é a habituação. O efeito ocorre em termos do tempo real e, dentro de certos limites, também em termos dos números de tentativas;

5. Quanto mais fraco for o estímulo, mais rápida e/ou mais acentuada é a habituação. Estímulos fortes podem produzir uma habituação não significativa;

6. Os efeitos do treino de habituação podem continuar além do zero ou além do nível assintótico da resposta;

7. A habituação da resposta para um dado estímulo exibe generalização de estímulo para outros estímulos;

8. A apresentação de um outro estímulo – geralmente forte – resulta numa recuperação da resposta habitada (desabilitação). Essa recuperação é vista por Thompson e Spencer (1966) como um processo de sensibilização, superposto à habituação, provocado pela apresentação de estímulo extra. A sensibilização seria independente do processo de habituação;

9. Sob aplicação repetida do estímulo desabilitador, o total da desabilitação produzida se habitua (habituação de desabilitação).

As nove características serviriam como definição operacional detalhada da habituação. Dessa forma, um fenômeno poderia ser chamado de habituação na medida em que satisfizesse estas características (SATO, 1995).

2.2 Refúgio

Outra forma de estudo da exploração em animais baseia-se na exposição do animal a alterações ambientais discretas e localizadas. Trata-se a inserção de um elemento novo ao ambiente em que o sujeito está (NAHAS, 1998). Ratos expostos a ambientes não familiares e a exposição a um elemento novo em ambiente familiar elicia, respectivamente, o comportamento exploratório do local e/ou dos objetos nele presentes (MARTINEZ & MORATO, 2004).

Em ambientes naturais, os sinais de ameaça podem surgir em forma de odores, vestígios de predadores, espaços abertos, entre outros. A partir deste reconhecimento o animal passa a apresentar um estado de alerta e um padrão comportamental de exploração cautelosa do ambiente, a fim de localizar o perigo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1987, F ANSELOW, 1991).

Estratégias de defesa são organizadas em função da distância entre predador e presa e a possibilidade de luta e/ou fuga. Neste caso, há o predomínio de comportamentos defensivos mais vigorosos, com a expressiva ativação de respostas comportamentais, neurovegetativas e neuroendócrinas caracterizando o estado de medo (BRANDÃO *et al.*, 1999; GRAEFF, 1996). A percepção do estímulo ameaçador pode ser inata, como no caso de um predador, ou aprendida como na associação de um ambiente ao perigo. (GRAEFF, 1996)

A introdução de novos estímulos em um ambiente familiar produz pequenos níveis de ativação e resulta numa aproximação e investigação da fonte de alteração, o que se vê para o estabelecimento de um novo modelo (NAHAS, 1998).

3. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento - LAPENEC, da Faculdade de Psicologia/UFAM, sendo sub-projeto de uma pesquisa de Mestrado intitulada “**O Efeito da Aprendizagem na Mediação das Respostas Emocionais de Ansiedade no Rato Wistar**”, orientada pelo Prof. Dr. José Humberto da Silva Filho e co-orientada pelo Prof. Dr. Walter. Adriano Ubiali.

O referido projeto já foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas, sob o numero 067/2012, conforme parecer emitido em 10/02/2012 (anexo).

A amostra foi composta por 64 sujeitos experimentais (ratos Wistar). Todos os animais eram machos, com idade entre 90 a 120 dias, pesando aproximadamente 280g a 350g, procedente do Biotério Central da UFAM, com biota desconhecida. Os animais foram divididos em dois grupos: (A) grupo controle; e (B) grupo experimental utilizando refúgio (Toca de Mamed) como reforço.

Foi utilizado o Campo Aberto (fig.1), de formato circular, com 90cm de diâmetro, confeccionado em madeira e revestido com fórmica na cor branca, plastificado com papel contact com paredes em acrílico transparente, de 50cm de altura, apoiado sobre uma mesa, piso liso, demarcado com cinco círculos concêntricos) sendo o círculo 1 o mais externo e o círculo 5 o mais interno), com 12cm de distância entre si, dividido em 60 setores numerados da periferia para o centro. Os setores são desenhados e numerados com pincel atômico preto, sendo que os números pares ficam à direita e os números ímpares à esquerda.

Através desse aparelho é possível a mensuração de comportamentos de ansiedade eliciados nos sujeitos quando expostos ao campo aberto e ao refúgio. Em ambientes naturais o animal tende a fugir do centro do campo aberto, pois nesta posição poderia se tornar presa

fácil para um predador. No caso do rato Wistar albino, o animal seria presa fácil para o falcão, seu maior predador natural. Quanto mais próximo da murada (parede do campo aberto) há um maior indicativo de ansiedade. Ou seja, quanto mais percorrer os círculos periféricos.

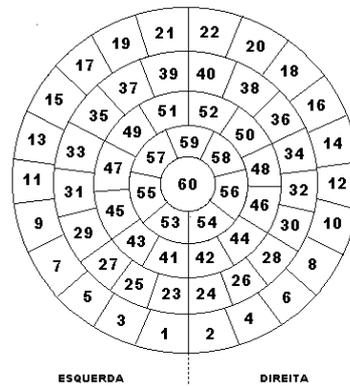


Figura 1

Foi utilizado também, o acessório Toca de Mamed constitui um adicional ao equipamento do Teste do Campo Aberto, que quando incluído na arena, fornece um refúgio ao animal. Suas dimensões são de 12 cm de altura, largura e profundidade (fig.2).



Figura 2

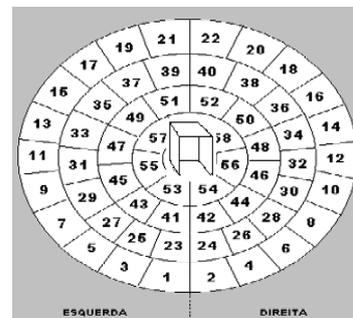


Figura 3

Esta medida é aproximadamente o tamanho de cada setor do Teste do Campo Aberto desenvolvido para ratos Wistar. Sua confecção é em madeira, que lhe dá uma massa sólida cujo peso não é manejável pelo animal, revestida de fórmica branca, conforme o assoalho do próprio teste. Não foi encontrada nenhuma referência a este tipo de acessório na literatura especializada, pois trata-se de um equipamento inédito. Seu uso, em geral no centro do campo

aberto (fig. 3), possibilita o aumento nas taxas de ambulação e permanência, bem como comportamentos exploratórios nos círculos mais concêntricos, além de diminuir as respostas autonômicas de ansiedade.

O grupo A (controle), não foi submetido a nenhuma intervenção. Os sujeitos foram apenas observados num período de dez minutos, durante as 4 sessões experimentais.

O grupo B (reforço positivo – refúgio) na primeira sessão, o animal não foi submetido a nenhuma intervenção, apenas os comportamentos apresentados foram registrados, durante o período de 10 minutos. Na segunda e terceira sessão, foi utilizado o equipamento Toca de Mamed colocado no centro do Campo Aberto. Na quarta sessão foram novamente observados os comportamentos dos sujeitos na ausência da Toca de Mamed.

Todas as sessões experimentais tiveram duração de 10 minutos. Os animais foram privados de água 48 horas antes do experimento e foram expostos às seguintes condições ambientais: todas as lâmpadas acesas, com acompanhamento visual direto e com vídeo.

A coleta de dados ocorreu ao longo de seis meses, de setembro/2012 a março/2013, nos dias e horários previamente definidos no cronograma. A estatística foi descritiva dos comportamentos de ansiedade e exploração (descritos na tabela 1 abaixo), em cada sessão experimental. Em seguida, foi realizada análise comparativa entre os grupos A (controle) e B (refúgio), por meio do teste *T de Students* seguido do teste *U de Mann-Whitney*. Foi realizada também, a análise multivariada do desempenho dos animais no teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de *Post-Hoc* de Bonferroni. Para todos os teste foi utilizado o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0. Para todos os gráficos foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6.0*.

Os comportamentos analisados foram:

Tabela 1: Tabela demonstrando, na primeira coluna, os comportamentos analisados e, na segunda coluna, sua descrição.

Cruzamento	Quatro patas de um dos compartimentos do assoalho da arena a outro.
Cruzamento C1	Quatro patas de um compartimento do assoalho da arena a outro no círculo 1.
Cruzamento C2	Quatro patas de um compartimento do assoalho da arena a outro no círculo 2.
Cruzamento C3	Quatro patas de um compartimento do assoalho da arena a outro no círculo 3.
Cruzamento C4	Quatro patas de um compartimento do assoalho da arena a outro no círculo 4.
Cruzamento C5	Quatro patas de um compartimento do assoalho da arena a outro no círculo 5.
Ambulação	Quatro patas de um círculo do assoalho da arena a outro.
Levantamento	Apoio sobre as patas posteriores com as patas anteriores nas amuradas do campo aberto ou não.
Salto	Levantamento concomitante das quatro patas.
Sobressalto	Tremor rápido com pequeno levantamento das patas anteriores (susto).
Fuga	Comportamentos de corrida em direção oposta ao refúgio.
Aproximação cautelosa	Aproximação lenta em direção à serpente, pata ante pata, com o ventre próximo ao chão.
Interações com o refúgio	Farejo, aproximação a menos de 1 cm da toca. Entradas e escalada sobre a toca.
Autolimpeza (<i>grooming</i>)	Lambadura das mãos e dos pêlos de todo o corpo.
Repouso	Ato de descansar com os olhos fechados e o corpo tocando o chão.

Comportamentos Salto, Sobressalto, Fuga e Aproximação Cautelosa não apresentaram nenhuma frequência nas sessões do experimento.

4. RESULTADOS

Dados apresentados em forma de gráfico de coluna com frequência (eixo Y) por sessões (eixo x) das médias das sessões 1 e 4. Com dados da primeira (1) e da última sessão (4) dos grupos controle e refúgio no experimento, observou-se uma redução significativa do comportamento Repouso e Interação. Os mesmos grupos não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em outros comportamentos.

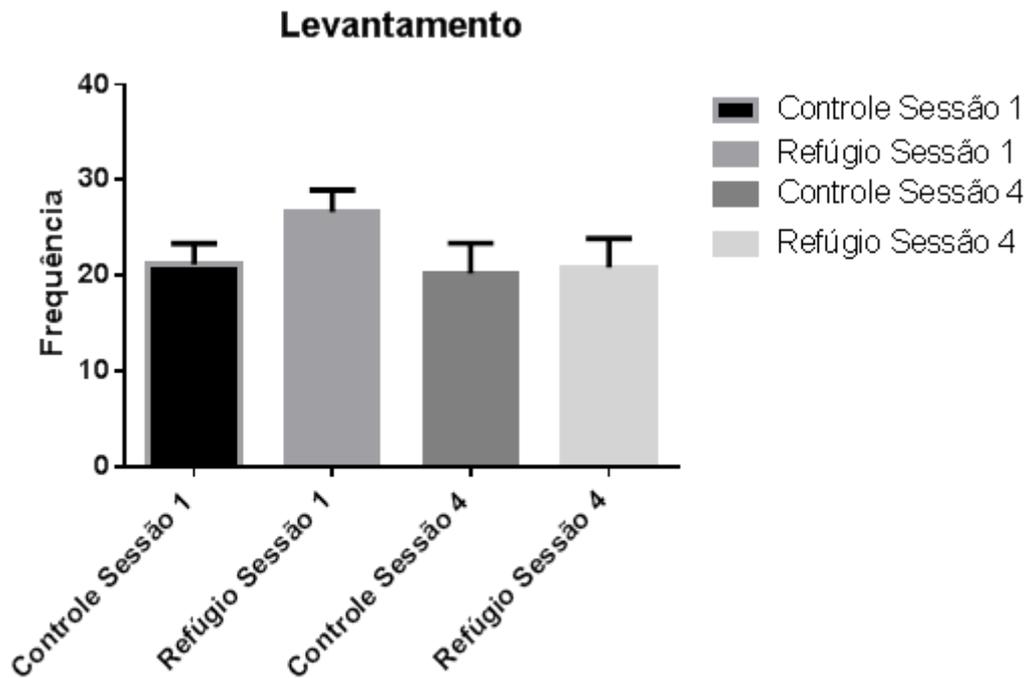


Gráfico 1: Gráfico das médias e erro padrão da média das frequências do comportamento de levantamento. Médias das frequências: controle sessão 1 (106,94 unidades), controle sessão 4 (129,53 unidades); refúgio sessão 1 (101,94 unidades), refúgio sessão 4 (110,94 unidades).

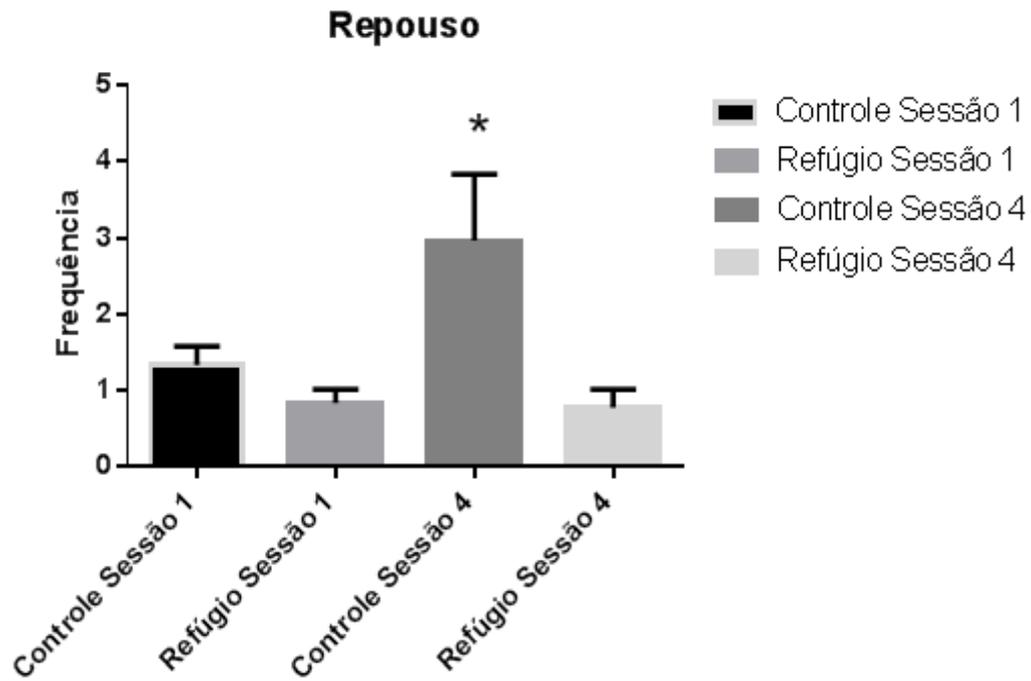


Gráfico 2: Gráfico das médias e erro padrão da média das frequências do comportamento Repouso. Foi considerado significativo * = $p < 0,05$. Médias das frequências: controle sessão 1 (1,34 unidades), controle sessão 4 (2,97 unidades); refúgio 1 (0,84 unidades), refúgio 4 (0,78 unidades).

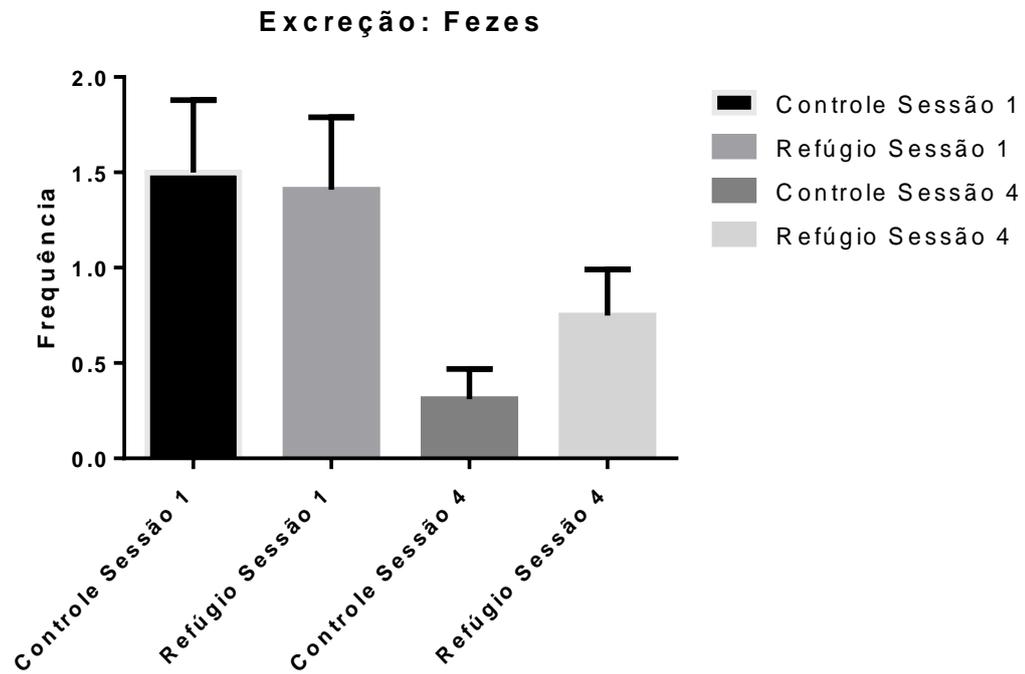


Gráfico 3: Gráfico das médias e erro padrão da média das frequências de excreção de fezes. Médias das frequências: controle sessão 1 (1,50 unidades), controle sessão 4 (0,31 unidades); refúgio 1 (1,41 unidades), refúgio 4 (0,75 unidades).

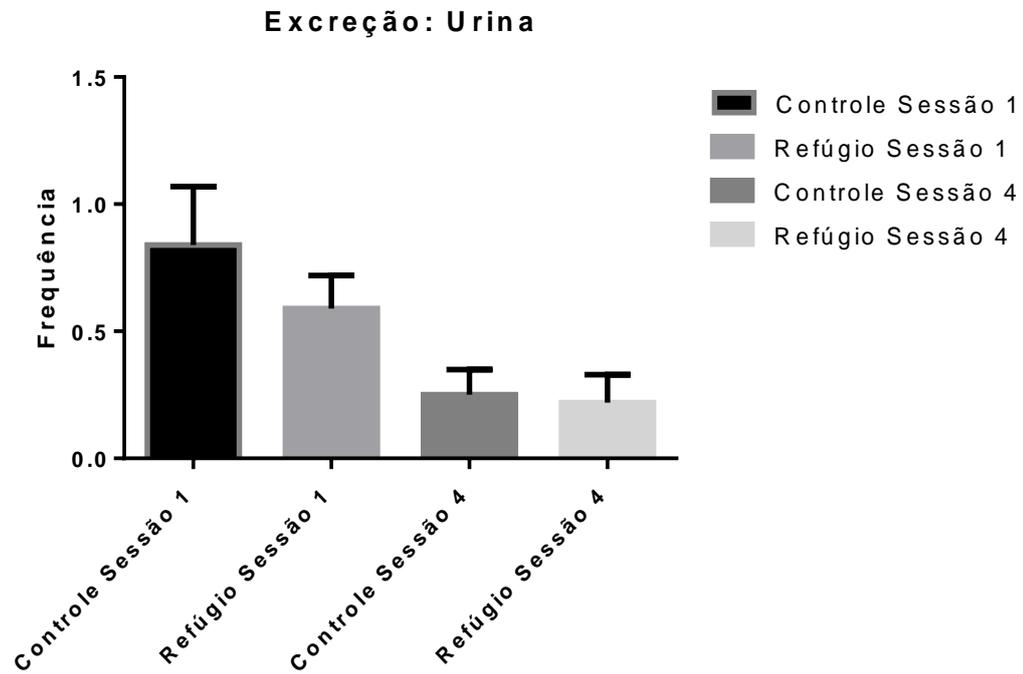


Gráfico 4: Gráfico das médias e erro padrão da média das frequências de excreção de urina. Médias das frequências: controle sessão1 (0,84 unidades), controle sessão 4 (0,25 unidades); refúgio 1 (0,59 unidades), refúgio 4 (0,22 unidades).

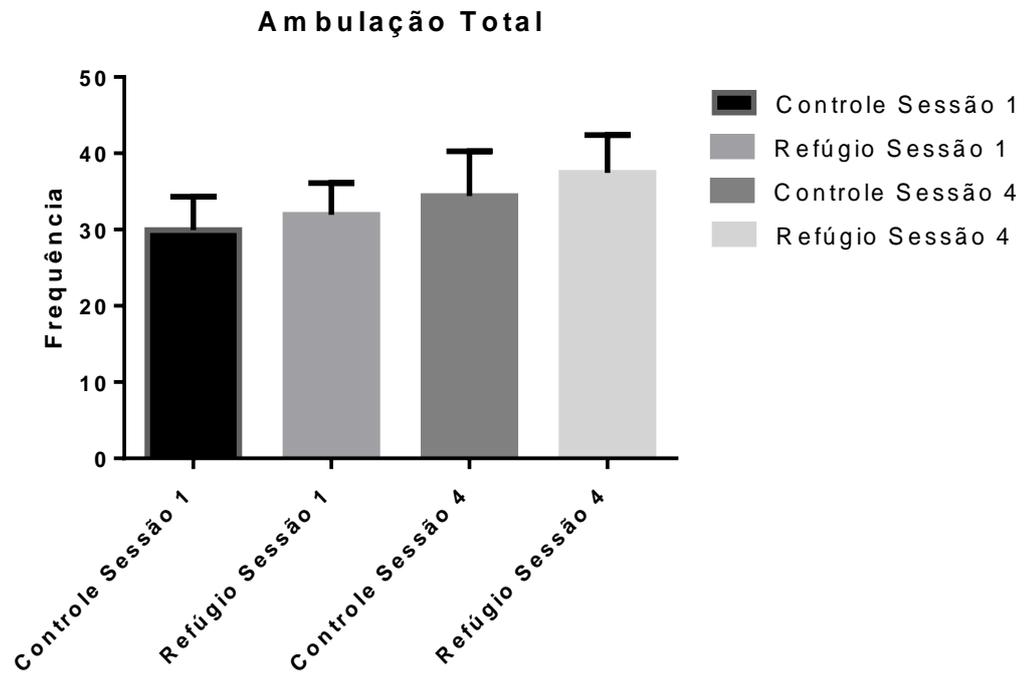


Gráfico 5: Gráfico do comportamento Ambulação. Médias das frequências: controle sessão1 (29,94 unidades), controle sessão 4 (34,41 unidades); refúgio 1 (31,94 unidades), refúgio 4 (37,44 unidades).

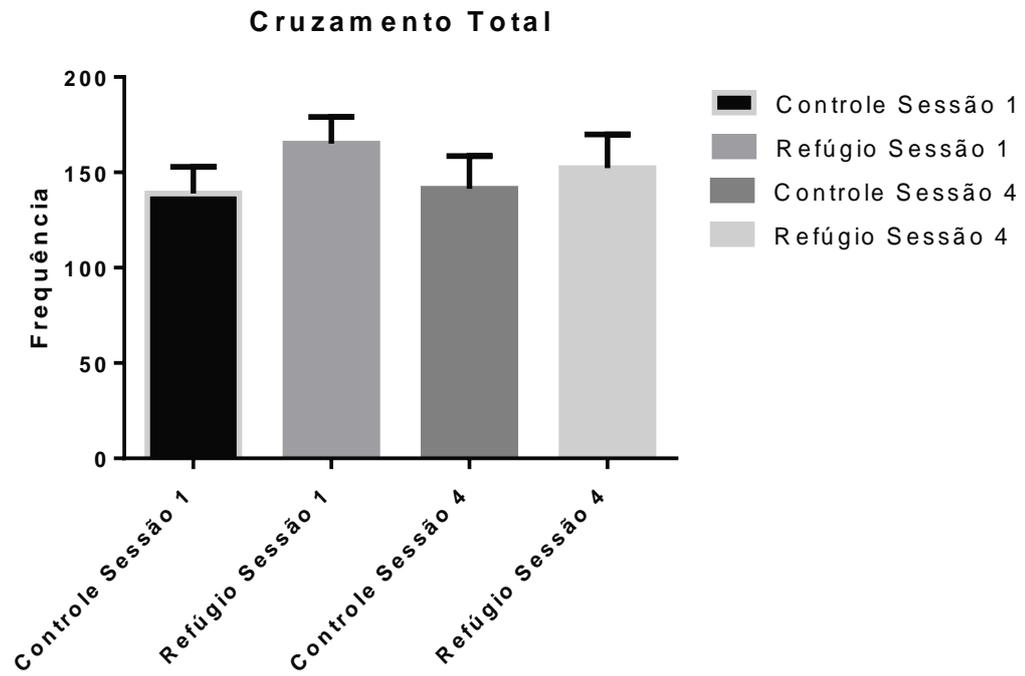


Gráfico 6: Gráfico do comportamento cruzamento. Médias das frequências: controle sessão1 (138,97 unidades), controle sessão 4 (141,44 unidades); refúgio 1 (165,13 unidades), refúgio 4 (152,31 unidades).

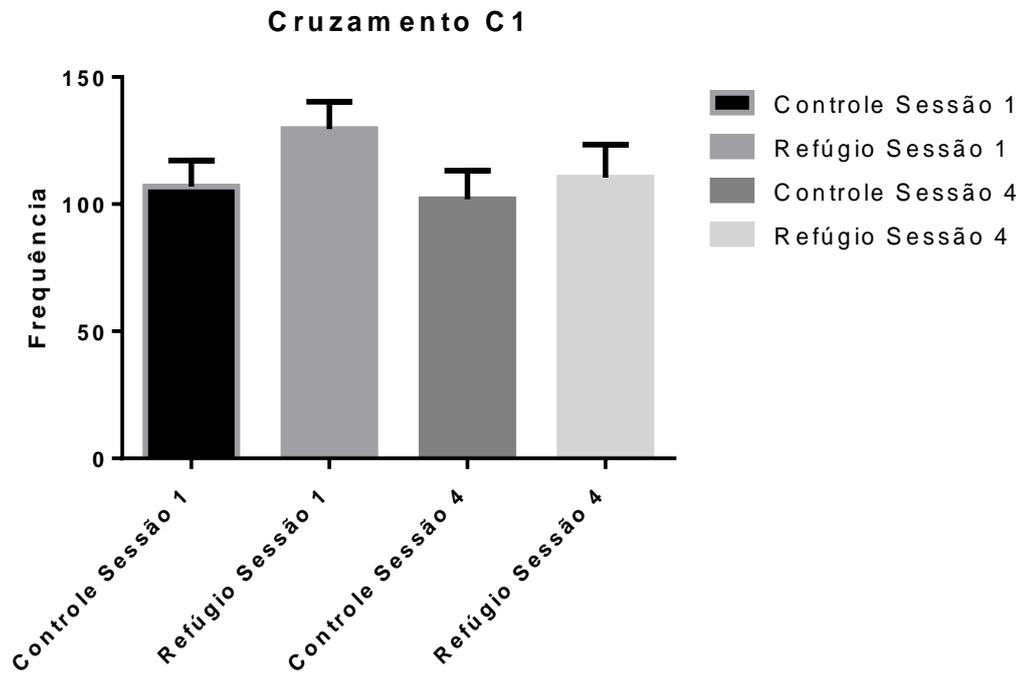


Gráfico 7: Gráfico do comportamento cruzamento no círculo 1. Médias das frequências: controle sessão 1 (106,94 unidades), controle sessão 4 (101,94 unidades); refúgio 1 (129,53 unidades), refúgio 4 (110,41 unidades).

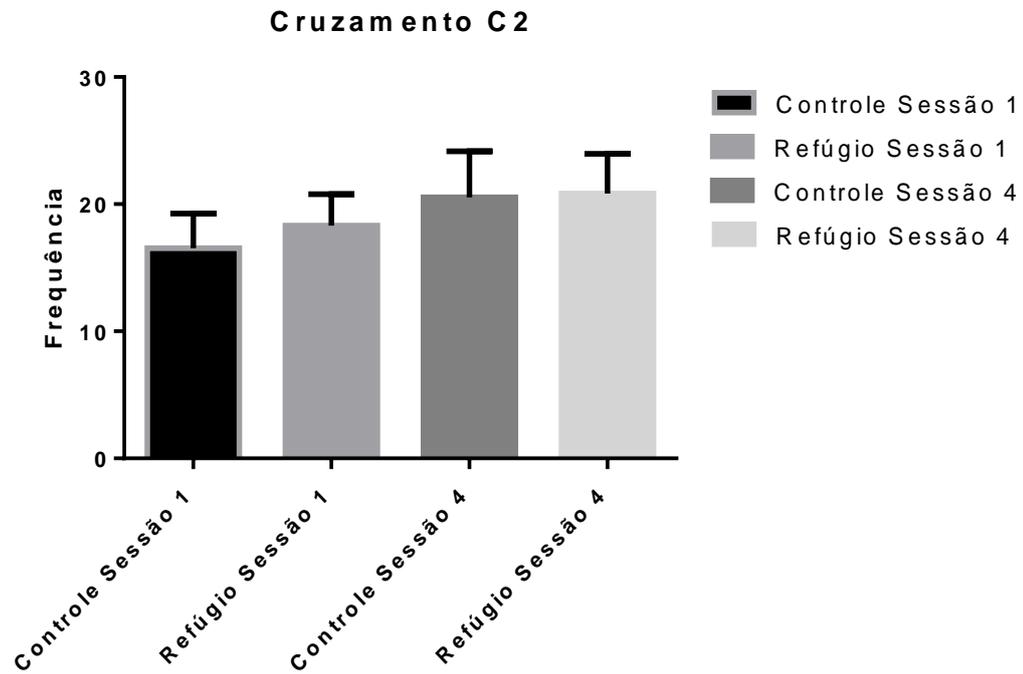


Gráfico 8: Gráfico do comportamento cruzamento no círculo 2. Médias das frequências: controle sessão 1 (16,53 unidades), controle sessão 4 (20,53 unidades); refúgio 1 (18,31 unidades), refúgio 4 (20,84 unidades).

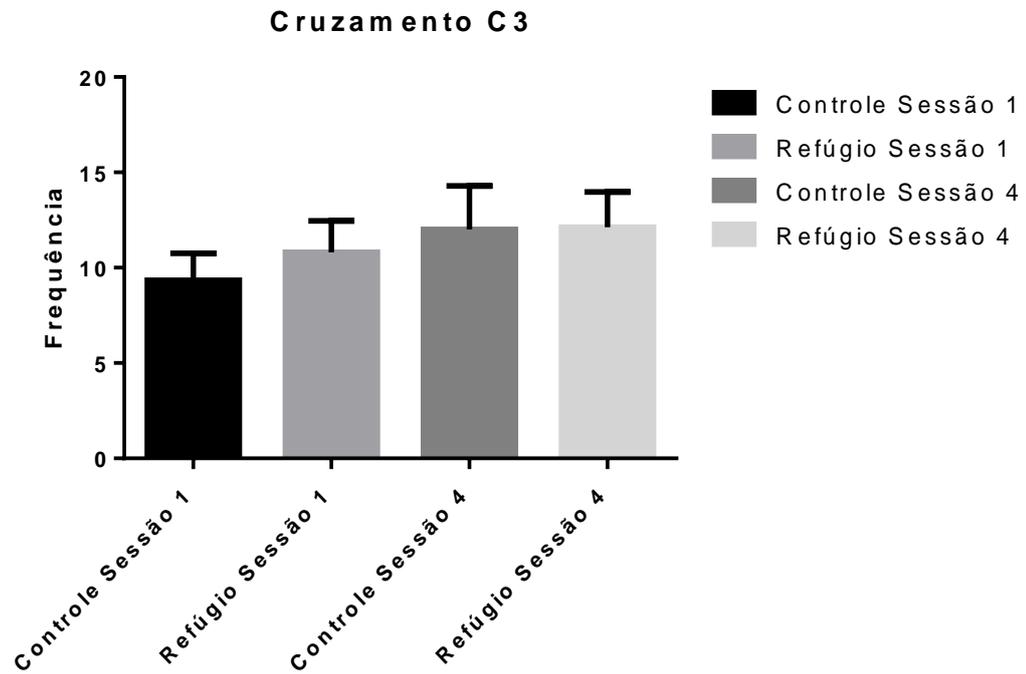


Gráfico 9: Gráfico do comportamento cruzamento no círculo 3. Médias das frequências: controle sessão 1 (9,34 unidades), controle sessão 4 (12,00 unidades); refúgio 1 (10,81 unidades), refúgio 4 (12,13 unidades).

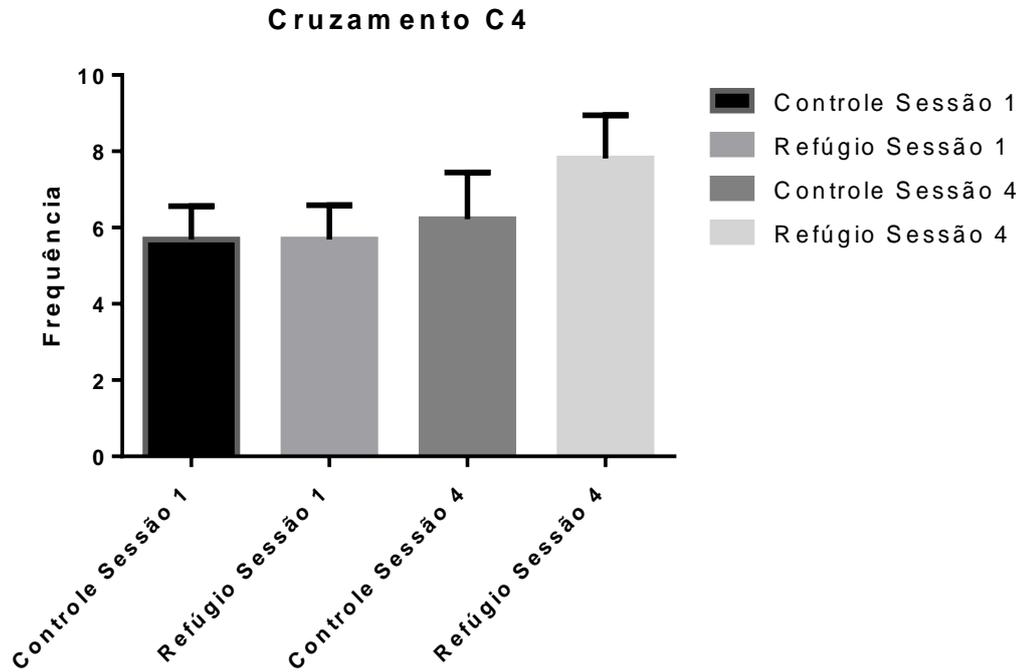


Gráfico 10: Gráfico do comportamento cruzamento no círculo 4. Médias das frequências: controle sessão1 (5,69 unidades), controle sessão 4 (6,22 unidades); refúgio 1 (5,69 unidades), refúgio 4 (7,81 unidades).

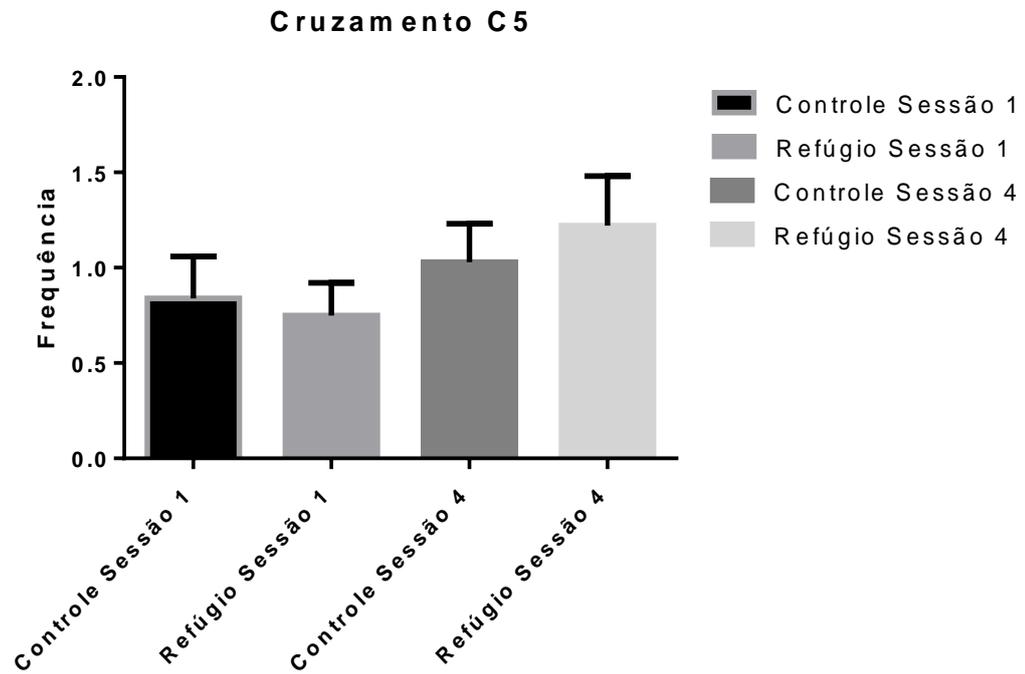


Gráfico 11: Gráfico do comportamento cruzamento no círculo 5. Médias das frequências: controle sessão1 (0,84 unidades), controle sessão 4 (1,03 unidades); refúgio 1 (0,75 unidades), refúgio 4 (1,22 unidades).

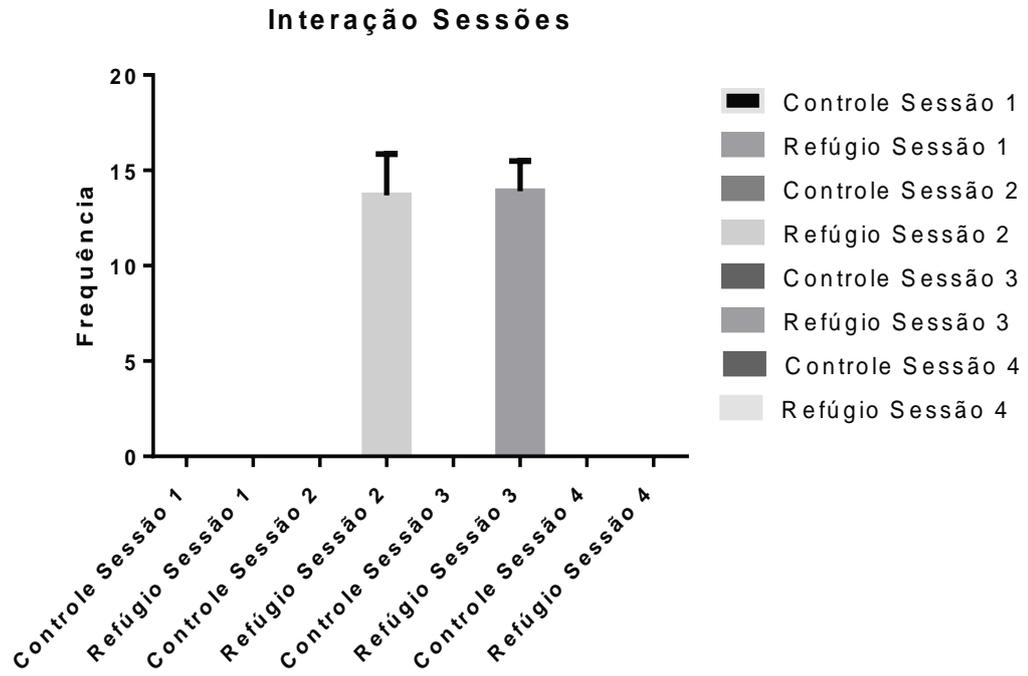


Gráfico 12: Gráfico do comportamento de interação por sessão.

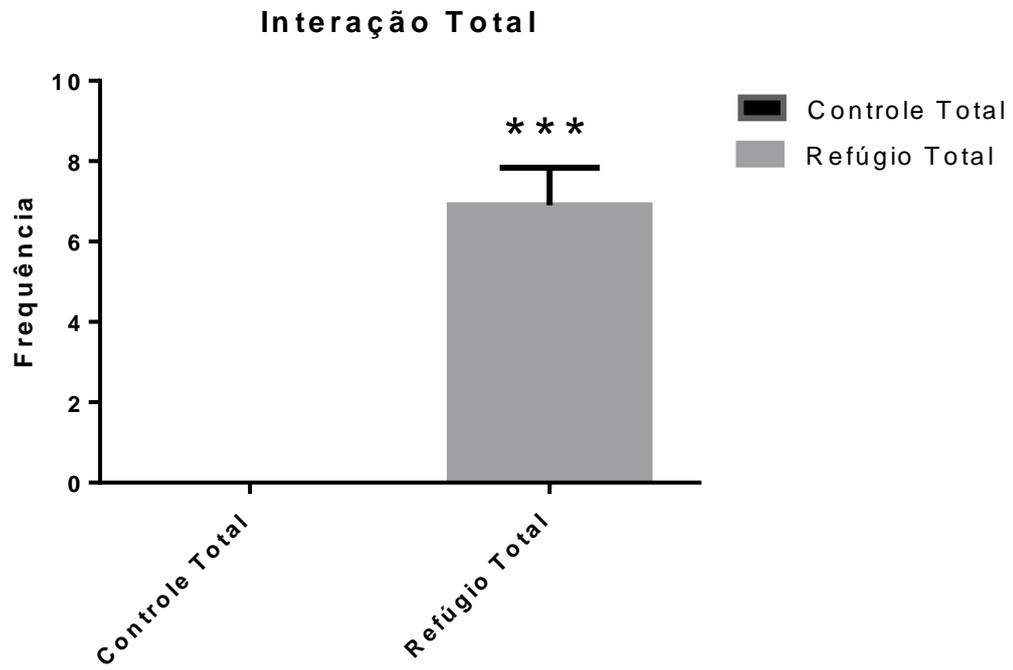


Gráfico 13: Gráfico do comportamento de interação. Comparação do grupo controle e grupo refúgio. Foi considerado significativo *** $p < 0,001$. Médias das frequências: controle sessão (0 unidades), refúgio (6,90 unidades).

5. DISCUSSÃO

Segundo RAMOS *et al* (1997), LISTER (1990), PRUT *et al* (2003), CAROLA *et al* (2002) os animais em estudo de campo aberto preferem o deslocamento na periferia. Porque naturalmente no centro do campo aberto o animal estará mais vulnerável aos seus predadores.

Isso corrobora com os dados obtidos neste estudo para cruzamento no círculo 1, o mais periférico, (em média 106,94 unidades na primeira sessão e 101,94 na última sessão no grupo controle e 129,53 unidades na primeira sessão e 110,41 unidades na última sessão no grupo refúgio) enquanto que no círculo 5, o mais central (em média 0,84 unidades na primeira sessão e 1,03 unidades na última sessão no grupo controle, e 0,75 unidades na primeira sessão e 1,22 unidades na última sessão do grupo refúgio), ou seja, a média do círculo 1 foi muito maior que a média do círculo 5. Isso mostra que os animais apresentaram um comportamento de ansiedade provavelmente devido à exploração de um ambiente novo, quando nos referimos a primeira sessão. Quando observamos o mesmo padrão de comportamento na quarta sessão, podemos inferir que o animal realmente busca ficar longe do centro onde poderia estar vulnerável. No caso do rato Wistar albino, o animal seria presa fácil para um falcão, seu maior predador natural, se o mesmo se posicionasse no centro de um campo aberto.

Em ambientes naturais, os sinais de ameaça podem surgir em forma de odores, vestígios de predadores, espaços abertos, entre outros. A partir deste reconhecimento, o animal passa a apresentar um estado de alerta e um padrão comportamental de exploração cautelosa do ambiente a fim de localizar o perigo (BLANCHARD and BLANCHARD, 1987, F ANSELOW, 1991). Neste caso também, pode ter ocorrido o fenômeno da habituação. Segundo Sato (1995) *apud* Thompson & Spencer (1966) a habituação caracteriza-se por dado que um particular estímulo elicia uma resposta, a aplicação repetida do estímulo resulta numa diminuição da resposta (habituação). O grupo controle (A) esteve presente no mesmo ambiente por quatro sessões de 10 minutos cada, explorando ao máximo esse ambiente principalmente nas primeiras sessões. Como não encontrou nada de novo em sua exploração, se acomodou e expressou o comportamento de repouso. Ou seja, o grupo controle (A) se habitou ao estímulo novo (campo aberto).

Ratos expostos a ambientes não familiares e a exposição a um elemento novo em ambiente familiar elicia, respectivamente, o comportamento exploratório do local e/ou dos objetos nele presentes (MARTINEZ & MORATO, 2004). Conseqüentemente, à medida que se adapta ao ambiente, o animal tende a aumentar a frequência do comportamento de repouso.

No estudo, o grupo controle manteve a afirmação de Martinez & Morato a média na primeira sessão foi de 1,34 unidades enquanto na quarta sessão 2,97 unidades.

O grupo do refúgio (B) foi exposto a Toca de Mamed por duas sessões intermediárias, representando um estímulo a mais quando comparado ao grupo controle (A). Além disso, este estímulo representa segurança e conforto para o animal, pois na natureza ele se abriga em tocas. A utilização da Toca de Mamed e as representações que ela gera eliciaram uma maior interação do animal com o ambiente. Como demonstrado no gráfico abaixo.

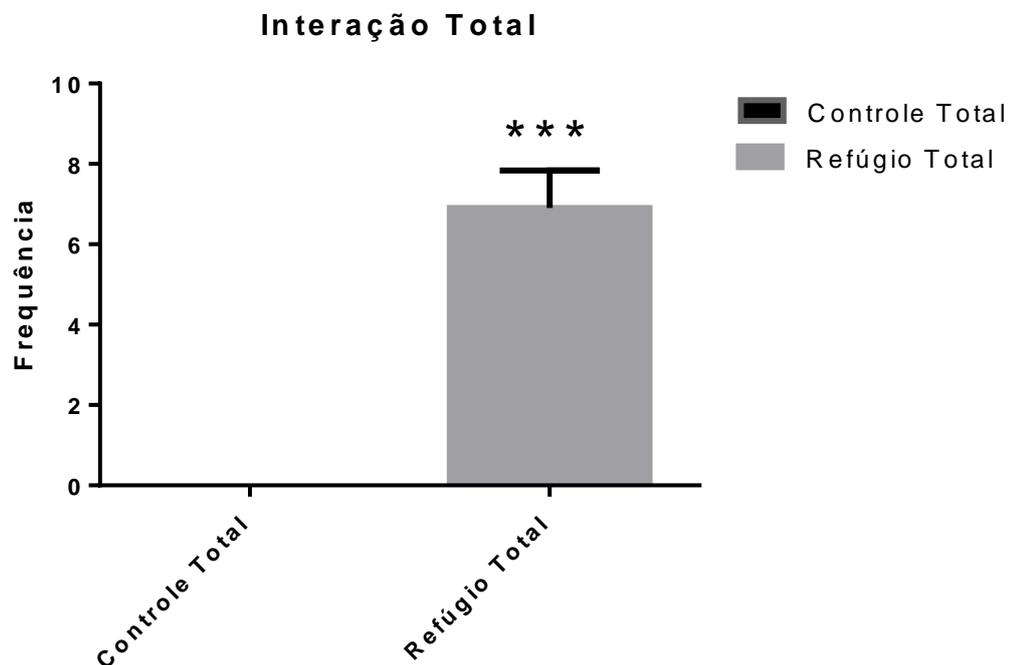


Gráfico 13: Gráfico do comportamento de interação. Comparação do grupo controle e grupo refúgio. Foi considerado significativo *** = $p < 0,001$. Médias das frequências: controle sessão (0 unidades), refúgio (6,90 unidades).

Como o animal tem o instinto natural de praticar a Atividade Exploratória [Refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas (BIRKE & ARCHER, 1983)]. Ele vai explorar o ambiente, neste caso além do campo aberto, o refúgio. Como podemos ver através do gráfico 13 de interação a essas duas sessões intermediárias tiveram um efeito estatisticamente significativo para esse grupo.

Ao retirar a Toca de Mamed na quarta sessão, o instinto de exploração do animal fez com que o mesmo procurasse o refúgio e assim mantendo o animal mais alerta e a média

baixa do comportamento de repouso apresentadas nas sessões anteriores. O grupo do refúgio não ocorreu o aumento do comportamento de repouso, a média se manteve baixa e estável (média da primeira sessão 0,84 unidades e da quarta sessão 0,78 unidades). O Gráfico 2 do comportamento de repouso abaixo mostra o efeito da toca no grupo refúgio e a significância gerada ao comparar com o grupo controle.

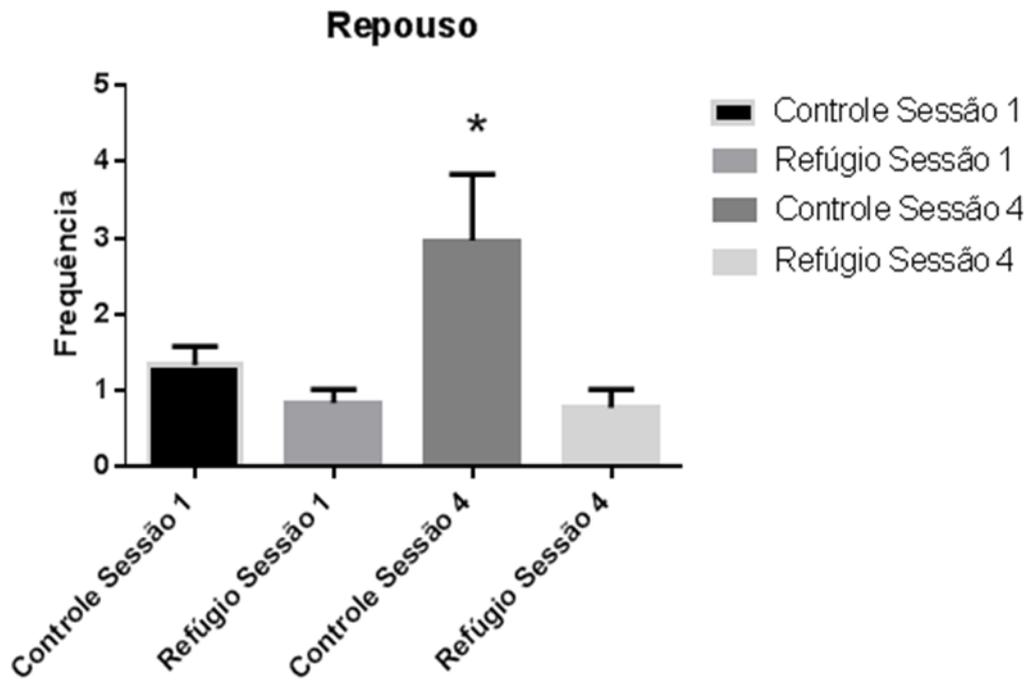


Gráfico 2: Gráfico do comportamento Repouso. Foi considerado significativo * = $p < 0,05$. Médias das frequências: controle sessão1 (1,34 unidades), controle sessão 4 (2,97 unidades); refúgio 1 (0,84 unidades), refúgio 4 (0,78 unidades)

6. CONCLUSÃO

O uso da Toca de Mamed no campo aberto é um estudo novo no meio científico. A toca procura representar experimentalmente o abrigo natural do rato na natureza. No que se refere a ansiedade pode-se observar que houve a diminuição da mesma no grupo experimental. Pode-se constatar isso através do aumento estatisticamente significativo do repouso no grupo controle e do aumento idem da interação no grupo do refúgio. No estudo a hipótese H1 se confirmou.

Este trabalho é pioneiro nas pesquisas no Amazonas e no Brasil e estimula-se que mais pesquisas ocorram nesta área e que este represente apenas um começo para o estudo do refúgio em campo aberto e nas pesquisas comportamentais com animais em nosso estado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON, R. L.; ATKINSON, R. C.; SMITH, E.E., BEM, D.J. & NOLENHOEKSEMA, S. **Introdução à Psicologia de Hilgard**. 13^a ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 2002.
- BIRKE, L.I.A; ARCHER, J. **Some issues and problems in the study of animal exploration**. In *Exploration in animals and humans*. University Press, Cambridge. 1983: 279p
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. **An Ethoexperimental approach to the study of fear**. *Psychology Research*, v. 33, p. 305- 316, 1987.
- BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. **Defensive Behaviors Fear and Anxiety**. In: **Handbook of Anxiety and Fear**. Vol. 17, Oxford, UK: Elsevier, 2008.
- BOLIVAR, V.J.; LEUSSIS, M. P. **Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics**. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 30, p. 1045-64, 2006.
- BRADLEY, M.M.; LANG, P.J. **Measuring emotion: behavior, feeling and physiology**. In: Lane, R.D., Nadel, L. (Eds.), *Cognitive Neuroscience of Emotion*. OUP, Oxford, 2000.
- BRAGHIROLI, E. M., BISI, G. P., RIZZON, L. A. & NICOLETTO, U. **Psicologia Geral**. 22^a ed. Petrópolis: Editora Vozes, 2002.
- BRANDÃO, M.L; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. **Neurochemical Mechanisms of the Defensive Behavior in the Dorsal Midbrain**. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 23, p. 863-875, 1999.
- BUENO, J. L. O. **O Imaginário Animal**. *Psicol. USP*, São Paulo, v. 8, n. 2, 1997 .
- CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. **Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice**. *Behavioral Brain Research* 2002; 134: 49-5.
- CATANIA, A. C. **Elicitation, reinforcement and stimulus control**. In: R. Glazer (Org.). *The nature of reinforcement*. New York: Academic Press, 1971, p.196-220
- CATANIA, A.C. **Aprendizagem**. Artmed: Porto Alegre, 1999.

- DENEMBERG, V.H. **Open Field Behavior in the Rat. What does it Means?** Am. N.Y. Acad. Sci. 159:852-9, 1969.
- DICKINSON, A. **Contemporary Animal Learning Theory.** Cambridge, Cambridge University Press, 1980.
- ELDER, C.M.; MENZEL, C.R. **Dissociation of Cortisol and Behavioral Indicators of Stress in an Orangutan (*Pongo Pygmaeus*) During a Computerized Task.** Primates 42, 2001.
- FANSELOW, M.S. **The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety.** In: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization. New York. Plenum Publishing Corporation, 1991, p. 151-173.
- FANSELOW, M.S.; PONUSAMY, R. **The use of Conditioning tasks to Model Fear and Anxiety.** In: Handbook of Anxiety and Fear, vol. 17, cap. 2.2, 2008, p. 29-48.
- FLINT, J. **Animal models of anxiety and their molecular dissection.** Seminar Cell Devel Biol 14: 37-42, 2003.
- GALLISTEL, C.R. **The Organization of Learning.** Cambridge, MA, MIT Press, 1990.
- GRAEFF, F.G.. **Ansiedade.** In: GRAEFF, F.G.; BRANDÃO M.L. **Neurobiologia das Doenças Mentais.** 3ª Ed. São Paulo: Lemos, 1996, cap. 5, p. 109-144.
- GRAEFF, F.G.; CRUZ, A.P.M.; ZAGROSSI, H.; LANDEIRA-FERNANDEZ. J. **Modelos Animais de Ansiedade: Implicações para a Seleção de Drogas Ansiolíticas.** Psicologia Teoria e Pesquisa. 1997; 13, n.3: 269-278.
- GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ C. **The Elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory, effects of diazepam.** Braz. J. Med. Biol. Res. 1993, 26:67-70.
- GROVES, P.M.; THOMPSON, R.F. **Habituation: A dual-process theory,** *Psychological Review* 77, 1970, pp. 419–450.
- HALL, C.S. **Emotional Behavior in the Rat.** In: *Defecation and Urination as a Measure of Individual Differences in Emotionality.* J. Comp. Psychol., 18: 385-403, 1934

LACERDA, G.F.M.L. **Ansiedade Em Modelos Animais: Efeito De Drogas Nas Dimensões Extraídas Da Análise Fatorial**. Tese de Mestrado. Não Publicada. Janeiro, 2006.

LE DOUX, J. **Emotional Processing, but not Emotions, can occur Unconsciously**. The Nature of Emotion: Fundamental Questions, Oxford, 1994.

LE DOUX, J. **The Emotional Brain. The Mysterious Underpinnings of Emotional Life**. Simon and Schuster, New York, 1996.

LISTER, G. **Ethologically-based animal models of anxiety disorders**. Pharmac. Ther 1990; 46: 321-340.

LIVTIN, Y.; PENTKOWSKI, N.S.; POBBE, R.L; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. **Unconditioned Models of Fear and Anxiety**. In: Handbook of Anxiety and Fear. Vol. 17, Oxford, UK: Elsevier, 2008.

MARTINEZ, R.; MORATO, S. **Tigmotatismo e exploração em ratos adultos e filhotes**. Rev. Etologia. jun. 2004, vol.6, no.1.

McNAUGHTON, N.; ZANGROSSI JR, H. **Theoretical Approaches to the Modeling of Anxiety in Animals**. In: Handbook of Anxiety and Fear. Vol. 17, Oxford, UK: Elsevier, 2008.

NAHAS, T.R. **O Teste do Campo Aberto**. Universidade de São Paulo, 1999. Disponível em: [http:// www.ib.usp.br/~gfxavier/cap11.html](http://www.ib.usp.br/~gfxavier/cap11.html)

PAUL, E.S.; HARDING, J.E.; MENDEL, M. **Mensuring Emotional Process in Animals: the Utility of a Cognitive Approach**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 29, 2005.

PEARCE, J.M. **An Introduction to Animal Cognition**. Hillsdale, NJ, Lawrence Erlbaum, 1987.

PRUT, L; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review**. European Journal of Pharmacology 2003; 60061:1-31.

RAMOS, A.; BERTON, O., PIERRE, M.; CHAUOFF, F. **A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains**. Behavioral Brain Research 1997; 85: 57-69.

RAMOS, A.; MORMÈDE, P. **Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach**. Neuroscience and Behavioral Review, vol. 22, 1998.

- ROITBLAT, H.L. **The Meaning of Representation in Animal Memory**. Behavioral and Brain Sciences, v.5, n.3, p.353-406, 1982
- SHETTLEWORTH, S. **Animal Cognition and Animal Behavior**. Animal Behavior, 61, 2001.
- SKINNER, B. F. **Ciência e Comportamento Humano**. 2ª ed. São Paulo: EDART, 1974
- SOKOLOV, E.N. **Neuronal models and the orienting influence**. In: *The central nervous system and behavior III*. M.A. Brazier, Editor: Macy Foundation, New York, 1960.
- THOMPSON, R.F.; SPENCER, W.A. **Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior**, Psychological Review 73, 1966, pp. 16–43
- THORPE, W.H. **Learning and instinct in animals**. London: Methuen, 1956.
- TOLMAN, E.C. **A Cognitive Maps in Rats and Man**. Berkeley, University of California Press, 1932
- VAUCLAIR, J. **Animal Cognition: an Introduction to Modern Comparative Psychology**. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1996.
- WHALEY, D. L.; MALOTT, R. W. **Princípios Elementares do Comportamento**. 1ª ed. São Paulo: E.P.U., 1980.
- YAMADA, M.T. **Manutenção e Extinção da Variabilidade Comportamental em Função de Diferentes Contingências de Reforçamento**. Dissertação de Mestrado. Não Publicada, USP, 2007.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

CERTIFICADO
2ª VIA

Certificamos que o protocolo nº 067/2011- CEEA, sobre "O efeito da aprendizagem na medição das respostas emocionais de medo e ansiedade no rato wistar" sob responsabilidade do **Prof. Dr. Walter Adriano Ubiali**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em 06 de Dezembro de 2011.

Manaus, 09 de Agosto de 2013

Prof. Dra. Cinthya Iamille Fritzh Brandão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013