

AMANDA CRISTINA BRAZ DE SOUZA

**ADAPTAÇÃO A UM NOVO AMBIENTE EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*).  
DESCRIÇÃO COMPORTAMENTAL E OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO  
SISTÊMICA DE DIAZEPAM.**

FLORIANÓPOLIS-SC  
2004

AMANDA CRISTINA BRAZ DE SOUZA

**ADAPTAÇÃO A UM NOVO AMBIENTE EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*).  
DESCRIÇÃO COMPORTAMENTAL E OS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO  
SISTÊMICA DE DIAZEPAM.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre junto ao Curso de pós- graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.  
Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto  
Co- orientador: Prof. Dr. Moacir Serralvo Faria

FLORIANÓPOLIS-SC  
2004



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo descrever o repertório comportamental de pombos (*Columba livia*) submetidos à um novo ambiente (gaiola nova, GN), e analisar os efeitos comportamentais da: 1) re-exposição ao ambiente experimental (7 e 14 dias depois ou 2 e 4 dias depois), 2) mudanças ambientais (ruído branco, fechamento das paredes da gaiola) e manipulações potencialmente aversivas (injeções i.p. de salina) e 3) administração i.p. de diazepam (DZP, 0,25 , 0,75 , 2,5 ou 7,5 mg/kg) ou de veículo (NaCl 0,9%), administrado 30 minutos antes da re-exposição (7 dias depois da primeira sessão). Em todas as exposições à GN, o comportamento de espiar (comportamento exploratório que consiste em movimentos balísticos da cabeça e do pescoço em todas as direções, sem locomoção) sofreu gradualmente adaptação durante os primeiros 10-14 minutos, sendo substituído pelo comportamento de imobilidade com movimentos de cabeça (movimentos angulares) e pela imobilidade completa. Este padrão mostrou habituação em re-exposições 2 e 4 dias depois da primeira sessão (sugerindo que esta resposta pode ser motivada por medo), mas foi semelhante a primeira exposição com 7 dias de intervalo entre as sessões. A associação de estímulos potencialmente aversivos, o ruído branco, a gaiola fechada e as injeções i.p. de salina, significativamente aumentaram a duração da imobilidade com movimentos de cabeça e reduziram o espiar, sugerindo que estas manipulações podem reduzir a atividade exploratória, possivelmente como efeito do aumento do medo. No entanto, no tratamento com DZP nenhuma dose afetou os comportamentos de espiar imobilidade com movimentos de cabeça, locomoção e auto-limpeza, e somente as duas doses mais altas de DZP aumentaram a imobilidade completa e a incidência de sinais motores posturais de sedação. No teste de conflito baseado em procedimentos operantes com pombos, doses semelhantes produziram efeitos “ansiolíticos” sem efeitos sedativos. Estes dados sugerem que o espiar pode ser modulado por outros sistemas motivacionais que não o medo, e que o teste da GN no pombo pode ser mais sensível aos efeitos sedativos do tratamento com benzodiazepínicos do que os testes baseados em comportamentos operantes neste animal.

## **INTRODUÇÃO**

A ansiedade em humanos pode ser considerada como uma ativação inapropriada de comportamentos defensivos (DSM IV, 1994; Millan, 2003). Como um estímulo aversivo, real ou potencial, pode gerar estes comportamentos tanto em humanos como em animais, a resposta do animal a um estímulo aversivo pode ser um modelo apropriado de ansiedade em humanos. Os comportamentos observados em animais, especialmente comportamentos que buscam neutralizar a ameaça percebida, podem coincidir com o estado emocional interno de ansiedade em humanos (Lister, 1990; Feldman e cols., 1997; Palanza, 2001). Assim, procedimentos utilizando a exposição de animais a um estímulo aversivo são propostos como modelos animais de psicopatologias como a ansiedade.

Estes métodos tornam possível o estudo das bases fisiológicas e neuroquímicas do comportamento utilizando, por exemplo, drogas com mecanismo de ação conhecido. Além disso, facilitam o estudo de drogas cujo mecanismo de ação é desconhecido; suas potências relativas, seus efeitos comportamentais e as relações entre atividade e estrutura. Permitem também o desenvolvimento de modelos de condições patológicas de humanos que não podem ser estudados diretamente nesta população (Barret e Miczek, 1995; Feldman e cols., 1997).

Os modelos animais de ansiedade geralmente envolvem a colocação do animal em um meio que supostamente induz alguma forma de conflito, por exemplo, entre obter uma recompensa ou esquivar-se de um estímulo potencialmente aversivo. (Lister, 1990; Millan, 2003). Estes modelos disponíveis têm sido classificados em respostas comportamentais: condicionadas ou não condicionadas (Griebel, 1995; Rodgers e Dalvi, 1997; Millan, 2003).

Os modelos com respostas condicionadas (também chamados de treinados ou aprendidos) requerem a seleção de um comportamento que pode ser modificado pelo ambiente ou pela ação de drogas. Os animais aprendem a executar uma determinada tarefa (geralmente apertar um disco) para receber a recompensa ou se esquivar da

punição. A recompensa (o reforçamento positivo) geralmente é água ou comida em animais privados destes recursos, e a punição (o reforçamento negativo) geralmente é um choque elétrico. O equipamento normalmente é automatizado e controlado por pistas que são apresentadas em momentos específicos (Barret e Miczek, 1995; Feldman e cols., 1997).

O primeiro teste de conflito condicionado foi publicado por Geller e Seifer em 1960, que consiste no treinamento de ratos que deviam executar uma determinada tarefa para receber uma recompensa associada a um modesto choque elétrico. Baseado neste modelo foram desenvolvidos outros testes de conflito, que incluíram sessões com e sem respostas punidas alternadas e/ ou sinalizadas, para facilitar a detecção das propriedades ansiolíticas específicas das drogas (Lister, 1990; Barret e Miczek, 1995; Millan, 2003). Nestes modelos, drogas de ação ansiolítica aumentam as respostas somente no componente em que ocorre o choque e não apresenta efeito nas respostas não punidas (Andrews e Broekkamp, 1993; Menard e Treit, 1999).

No entanto, este tipo de modelo apresenta alguns pontos passíveis de crítica (Pellow e cols., 1985; Barret e Vanover, 1993; Choleris e cols., 2001; Kavaliers e Ossenkopp, 2001; Palanza, 2001; Wall e Messier, 2001; Bourin e Hascöet, 2002). Estes procedimentos envolvem privação de comida e água, e as drogas de ação ansiolítica no geral interferem no apetite, podendo aumentar o componente motivacional que leva o animal a executar um número maior de respostas para obter a recompensa (Cooper e Posadas-Andrews, 1979). Além disso, envolvem estímulos aversivos (choque elétrico) que não aparecem no meio natural do animal, podendo provocar padrões de comportamento artificiais.

Os modelos com **respostas não condicionadas** (também chamados de etológicos) envolvem comportamentos espontâneos do animal ingênuo a uma situação não familiar (Lister, 1990; Andrews e Broekkamp, 1993; Choleris e cols.; 2001). Estes procedimentos

experimentais registram padrões de comportamentos espécie-específicos, como exploração, alimentação, reprodução, cuidados maternos, bem como agressão e defesa. Embora estes comportamentos possam ser modificados pela experiência e sob condições controladas seja possível reproduzi-los, eles são respostas inatas e não requerem condicionamento para sua expressão (Barret e Miczek, 1995). Dessa forma, tem sido proposto que modelos baseados nestes comportamentos podem ser mais adequados ao estudo de respostas comportamentais de ansiedade do que protocolos com respostas condicionadas (Treit, 1985; Barret e Vanover, 1993; Blanchard e cols., 1993; Griebel e cols., 1995; Griebel, 1996; Choleris e cols., 2001).

Como este tipo de modelo animal não requer necessariamente um equipamento automatizado, ele não é dispendioso e é geralmente fácil de usar. O comportamento analisado é espontâneo, portanto não requer treinamento dos animais, tornando os testes mais rápidos de executar do que os modelos condicionados. Além disso, não requerem privação de alimentos ou água e utilizam um estímulo natural. No entanto os efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos podem ser confundidos com mudanças na atividade motora (Barret e Miczek, 1995; Dawson e Tricklebank, 1995).

Dos vários modelos etológicos de ansiedade existentes, os de maior relevância para o presente estudo são o teste de campo aberto e o da caixa claro/ escuro. Ambos têm como base a exposição do animal a um novo ambiente. Nesta situação, o comportamento do animal poderia resultar de uma competição entre uma tendência exploratória e uma tendência a retrair-se ou imobilizar-se, caracterizando uma situação de conflito (Kelley, 1993; Lister, 1990). Esta situação pode gerar uma série de respostas comportamentais e fisiológicas, como a inibição do comportamento exploratório, congelamento, avaliação de risco, aumento da frequência cardíaca, defecação e o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. Essas reações podem ser



interpretadas como a ativação do sistema defensivo do animal em uma situação potencialmente perigosa (Palanza, 2001).

O teste de campo aberto é um modelo muito popular na pesquisa comportamental, pois requer um aparato mínimo e é rápido de executar (Lister, 1990; Kavaliers e Ossenkopp, 2001; Eilam, 2003). Ele consiste na mensuração de comportamentos executados pelo animal (geralmente roedor) colocado em um espaço novo e aberto, do qual a fuga é prevenida por paredes circundantes (Walsh e Cummins, 1976; Nahas, 1999; Choleris e cols., 2001; Eilam, 2003). Em roedores, este teste baseia-se na tendência natural desta espécie de permanecer perto das paredes de um ambiente novo (neofobia), para buscar proteção. O tempo gasto e o número de entradas no setor central do aparato experimental são usados como índice de “ansiedade”, pois drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo gasto no setor central sem mudanças concomitantes na atividade locomotora geral (Menard e Treit, 1999).

Como o medo e ou a curiosidade são fatores motivacionais desencadeadores da atividade exploratória e, em geral, para ocorrer exploração o animal precisa se locomover, a atividade locomotora é um dos índices de ansiedade mais utilizados no teste de campo aberto. Ela é medida pela contagem do número de seções do ambiente ultrapassadas pelo animal (Geyer, 1990; Nahas, 1999). No entanto, esse índice é questionável, pois mecanismos que não estão envolvidos com a ansiedade podem afetá-la. Por exemplo, algumas manipulações como a administração de agonistas dopaminérgicos ou lesões em certas regiões encefálicas induzem hiperatividade, sem que as respostas sejam necessariamente de exploração (Lister, 1990; Nahas, 1999). A defecação também pode ser usada como índice de ansiedade, porém deve ser considerada com cautela, pois está relacionada com a ingestão de comida e algumas drogas podem afetar a motilidade gastro intestinal (Lister, 1990).

O teste claro/escuro permite que roedores explorem livremente dois compartimentos interconectados (um escuro e o outro claro), que variam de tamanho, cor e iluminação. Ele é baseado na aversão inata desses animais a áreas iluminadas e abertas (Holmes e cols., 2001; Hascoët e cols., 2001; Bourin e Hascoët, 2002), assim quando esses animais são colocados no compartimento claro eles demonstram uma latência curta para sair e quando colocados na área escura demoram mais para sair para a área clara. Após o tratamento com drogas de ação ansiolítica o tempo de permanência na área clara e a latência para sair da mesma aumentam, sugerindo que a possível atividade exploratória medida neste protocolo não é simplesmente um efeito motor generalizado (Hascoët e cols., 2001; Bourin e Hascoët, 2002).

A redução da ansiedade é indicada também pelo aumento das transições entre os dois compartimentos (Menard e Treit, 1999; Holmes e cols., 2001; Bourin e Hascoët, 2002). No entanto, a análise dos comportamentos realizados em cada compartimento torna o teste mais sensível a drogas de ação ansiolítica, pois permitem verificar os efeitos da droga na atividade motora geral (Hascöet e Bourin, 1998; Rodgers e cols., 1999). Além disso, um comportamento em especial, a postura de alongamento atento, que é uma forma de avaliação de risco, parece refletir o conflito entre a exploração e a esquiva, em ambientes potencialmente perigosos. Neste comportamento, o animal se alonga para frente e em seguida se retrai para a posição inicial. A administração de drogas de ação ansiolítica claramente diminui a postura de alongamento atento e este tem ainda alta correlação com os níveis plasmáticos de corticosterona (Griebel e cols., 1997; Rodgers e cols., 1999; Holmes e cols., 2001).

Em uma grande variedade de modelos animais há evidências de que os agonistas benzodiazepínicos (BZDs) produzem efeitos ansiolíticos consistentes (Pesold e Treid, 1994; Menard e Treit, 1999). Receptores BZDs ligados ao complexo receptor GABA-A são particularmente abundantes nas estruturas límbicas envolvidas na modulação de estados

de ansiedade como no septo, hipocampo e amígdala (Cherubini e Conti, 2001; Mody, 2001; Millan, 2003). Os agonistas BZDs facilitam a ação inibitória do GABA, que por sua vez gera uma hiperpolarização neuronal através da abertura de canais permeáveis ao cloro, aumentando o limiar requerido para despolarizar a membrana e gerar um potencial de ação, inibindo principalmente neurônios serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos (Barret e Miczek, 1995; Rang e cols., 1997; Menard e Treit, 1999; Millan, 2003). Esses ansiolíticos clássicos são as drogas mais conhecidas e mais amplamente prescritas para o tratamento de distúrbios de ansiedade (Handley, 1994; Rang e cols., 1997). Muitos modelos animais de ansiedade consideram preditivo da atividade terapêutica a demonstração da resposta aos BZDs (Pratt, 1992; Blanchard e cols., 2003; Prut e Belzang, 2003; Millan, 2003). Entretanto, o uso crônico dessas drogas está associado ao desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos ansiolíticos e uma síndrome de abstinência ansiogênica com a interrupção da administração crônica da droga (Jones e Blackburn, 2002).

Tais efeitos colaterais comuns aos BZDs não são compartilhados pelos ansiolíticos que atuam sobre os receptores serotoninérgicos, em especial no receptor 5-HT<sub>1a</sub>. Drogas desse tipo, como o 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) e derivados da pirimidinilpiperazina (buspirona, ipsapirona, gepirona, tandospirona, entre outros) também demonstram ação ansiolítica e antidepressiva (Barret e Vanover, 1993; Bell e Hobson, 1994; Barret e Miczek, 1995; De Vry, 1995; Rang e cols., 1997).

Apesar da eficácia dos agonistas dos receptores 5-HT<sub>1a</sub> em distúrbios de ansiedade ser bem estabelecida na clínica, experimentalmente essas drogas demonstram resultados contraditórios em vários modelos ansiedade com roedores (Barret e cols., 1994; Griebel e cols., 1997; Rex e cols., 1998; Kleven e Koek, 1999b). Em modelos com respostas condicionadas, a buspirona e o 8-OHDPAT podem demonstrar efeitos ansiolíticos (Higgins e cols., 1988; McMillan, 1990; Stefanski e cols., 1993; Schreiber e

DeVry, 1993), ansiogênicos (Hodges e cols., 1987; Barret e Witkin, 1991; Stefanski e cols., 1993) ou ainda não apresentar efeito (Carli e cols., 1989; McMillan, 1990; Barret e Witkin, 1991). Em modelos tradicionais com respostas não condicionadas, como o labirinto em cruz elevado, o campo aberto e a caixa claro/escuro estas drogas também demonstram efeitos ansiolíticos (Crawley, 1981; Costall e cols., 1988; Costall e cols., 1989; Onaivi e Martin, 1989; Lister, 1990; Lopez-Rubalcava e cols., 1992; Imaizumi e cols., 1994a; Imaizumi e cols., 1994b; Griebel e cols., 1997; Hascoët e Bourin, 1998), ansiogênicos (Higgins e cols., 1988; Lister, 1990; Klint, 1991; Stefanski e cols., 1993) ou não apresentam efeito (Carli e cols., 1989; Lister, 1990; Stefanski e cols., 1993; File e Gonzalez, 1996; Gonzales e cols., 1996; Griebel e cols., 1997). O mesmo ocorre em primatas não humanos (Barret e cols., 1986; Barret e cols., 1994). No entanto, investigações sobre a performance de pombos em testes com respostas punidas demonstraram, que esta espécie é sensível a ambos ansiolíticos BZDs e não BZDs (Wuttke e Kelleher, 1970; Barret e cols., 1985; Barret e cols., 1986; Barret, 1992; Barret e Vanover, 1993).

Alguns procedimentos e resultados do modelo de conflito utilizando o pombo (Barrett, 1992; Kleven e Koek, 1996; Kleven e Koek, 1999a e 1999b) são de particular importância para o presente estudo. Este modelo consiste basicamente no estabelecimento do comportamento de bicar um disco ou chave, reforçado pela apresentação de comida (grãos, por 3-4 segundos), em animais privados de alimento até ostentarem um peso corporal 80 - 85 % do observado com o acesso *ad libitum* à comida. O comportamento de bicar o disco é mantido em um esquema múltiplo de razão fixa de reforçamento (FR30), e é punido, durante componentes experimentais alternados, com um choque elétrico no púbis (1-5 mA AC, 200 ms), simultâneo à apresentação de comida após a trigésima bicada no disco. Este procedimento reduz a taxa de bicadas para  $0,07 \pm 0,01$  respostas/segundo durante o componente experimental em que a resposta é punida,

enquanto que durante o componente com respostas não punidas o pombo realiza  $2,19 \pm 0,06$  respostas/segundo (Kleven e Koek, 1996 e 1999 a).

Os agonistas de receptores 5HT<sub>1a</sub>, assim como os benzodiazepínicos, aumentam a taxa de respostas durante o componente com punição, supostamente por atenuar seletivamente o conflito entre a busca por comida e o elemento aversivo imposto pelo choque. Nas doses em que estes efeitos ocorrem, estas drogas não alteram as respostas durante o componente sem punição da sessão de registro, o que sugere ausência de efeitos da droga ou dose em outros domínios funcionais que poderiam acarretar diminuição da frequência de respostas não punidas (efeitos sedativos). Nestes estudos, a redução das respostas não punidas é provocada por doses altas de agonistas 5HT<sub>1a</sub>, enquanto as doses que possuem efeitos ansiolíticos não reduzem nem aumentam o já intenso ritmo de bicadas do pombo durante o componente sem punição.

No estudo realizado por Kleven e Koek (1999), a comparação das doses que causam um aumento na resposta punida do diazepam com as doses para a mesma droga utilizada em humanos revelou uma correlação positiva alta ( $r=0,90$ ). A correlação entre as potências relativas para a diminuição da resposta não punida e os efeitos terapêuticos também foi significativa ( $r=0,92$ ). A resposta punida em pombos é também aumentada por um grande número de agentes ansiolíticos conhecidos como o etanol, os barbitúricos e o metaqualona, mas o aumento na resposta punida não ocorre após a administração de estimulantes psicomotores, antidepressivos não serotoninérgicos, componentes anti-psicóticos ou opióides (Barret e Vanover, 1993).

Além disso, vários estudos de discriminação de drogas em pombos tem sido realizados no pombo, usando o 8OH-DPAT ou buspirona como estímulo de treinamento, demonstrando notável seletividade para drogas com alta afinidade por receptores 5-HT<sub>1a</sub> (Barret, 1992). Portanto, esta espécie pode ter um valor considerável na avaliação da

base neurofarmacológica da ansiedade e dos efeitos de drogas ansiolíticas (Mansbach e Barret, 1987; Barret, 1992; Barret e Vanover, 1993).

No entanto em relação à modelos com respostas não condicionadas de ansiedade em aves, pouco se encontra na literatura. Os animais testados são galinhas ou codornas, geralmente com poucos dias de vida. O modelo mais utilizado é o campo aberto, e assim como nos modelos com os roedores, o principal índice avaliado é a atividade exploratória. Como este comportamento nestas aves consiste em deambulação, exploração visual e o bicar o ambiente, e estes comportamentos são mais freqüentes na gaiola residência do que no campo aberto, conclui-se que o medo exerce um efeito inibitório sobre a atividade exploratória neste modelo. Desta forma, o restabelecimento social e os comportamentos exploratórios só podem ser expressados quando efeitos inibitórios do medo diminuïrem suficientemente, ou seja, pássaros que permanecem em silêncio e inativos no campo aberto são considerados mais ansiosos que os animais que vocalizam, caminham, ou exploram o ambiente (Faure e cols., 1983; Jones e Faure, 1991; Mills e cols., 1993; Jones e Roper, 1997; Clarke e Jones, 2000).

Outro modelo utilizado nestas aves é um teste semelhante à caixa claro / escuro utilizada em roedores, que consiste em uma caixa com dois compartimentos, um claro e outro escuro, separados por uma porta removível. O animal é colocado no compartimento escuro e a porta é retirada. Codornas, geneticamente selecionadas com baixo nível de corticosterona plasmática, em resposta a uma breve imobilização mecânica, vocalizam mais antes da porta abrir, e emitem uma latência menor para emergir a cabeça e o corpo para o compartimento claro em relação aos animais com altos níveis de corticosterona plasmática (Jones e cols., 1999 b). Além disso, codornas selecionadas em várias gerações por apresentar uma curta imobilidade tônica (postura imóvel, rigidez muscular, tremores, olhos fechados e pouca responsividade a estímulos externos) em resposta a uma breve restrição dos movimentos, emergem a cabeça da caixa para área clara mais

cedo do que codornas com imobilidade tônica longa (Jones e cols., 1991). Portanto, o medo inibe padrões de comportamentos motivados por outros sistemas e a novidade é um potente desencadeador do medo. Assim, as galinhas e as codornas tendo o medo aumentado, apresentam as seguintes características: congelamento, silêncio, inatividade em um campo aberto, atraso para emergir a cabeça do compartimento fechado da caixa para uma área exposta e não familiar e prolongada duração da imobilidade tônica (Faure e cols., 1983; Jones e cols., 1991).

Com pintainhos, um estudo que envolveu o estresse social, demonstrou que ansiolíticos conhecidos (meprobamato, pentobarbital, clordiazepóxido, imipramina e clonidina) atenuaram a vocalização de aflição provocada pela separação dos companheiros, enquanto que a buspirona e drogas de ação ansiogênica (anfetamina, escopolamina, cafeína, clorpromazina e haloperidol) não afetaram este comportamento, sugerindo que este modelo com galinhas é sensível a drogas de ação ansiolítica, exceto as que atuam no receptor 5-HT<sub>1a</sub> (Feltenstein e cols., 2004).

No entanto, no pombo que, como indicado anteriormente, demonstra relevância para testes com drogas de ação ansiolítica, não existem modelos não condicionados de conflito. Além disso, os índices geralmente analisados nas aves são a imobilidade tônica e as vocalizações, comportamentos estes raramente observados no pombo. Parece, portanto, importante investigar o comportamento espontâneo, não condicionado, de pombos em um novo ambiente como uma possível alternativa para examinar o efeito de drogas ansiolíticas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo descrever o repertório comportamental de pombos (*Columba livia*) submetidos a um novo ambiente. Para tanto analisamos o comportamento de pombos submetidos a uma gaiola nova semelhante a uma gaiola-residência. Neste ambiente, examinamos: 1) a ocorrência de habituação dos comportamentos com a repetição da exposição, 2) os efeitos da associação de outros

estímulos ao novo ambiente e 3) o efeito agudo da administração periférica de várias doses de diazepam.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1- ANIMAIS

Utilizou-se pombos de ambos os sexos, criados no Biotério Central da UFSC, com peso corporal variando entre 300-400 g e mantidos no biotério setorial do CFS-CCB em gaiolas individuais de arame (50 x 50 x 50 cm, com o assoalho coberto com papel) dispondo de água e alimento granulado para aves (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda, Itajaí, SC) *ad libitum* em uma sala com temperatura controlada entre 22-24°C, um ciclo claro-escuro de 12 horas (luz das 7-19 h) e com acesso visual a outros animais (machos e fêmeas) colocados em gaiolas anexas. Estes animais permaneceram no biotério setorial do CFS-CCB por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos. Este protocolo de pesquisa, cadastrado sob os números 149/CEUA e 23080.009607/2002-88, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA/UFSC).

## 2- AMBIENTE

O ambiente ao qual o animal foi submetido será chamado de GN (gaiola nova), ele é composto de uma gaiola de grade de arame, com dimensões similares a de sua gaiola residência (50 cm de comprimento, 50 cm de altura e 50 cm de largura), porém sem comedouros, bebedouros ou poleiros (Fig. 1). Esta gaiola está localizada em uma câmara ao abrigo de sons e da presença visual de outros animais. Registrou-se, em vídeo, os comportamentos desses animais por 30 minutos (sessão) através de uma câmera de vídeo (JVC, GR-AX247, VHS compacta) postada a 150 cm da grade lateral da gaiola.



**Figura 1** - Vista anterior da GN.

### 3- O REGISTRO COMPORTAMENTAL

As sessões registradas em fita VHS compacta, foram observadas duas vezes (vídeo cassete conectado a uma televisão de 14"). A primeira análise foi para transcrever a duração e a freqüência de eventos lentos e a segunda para registrar a freqüência do comportamento de espiar. Para a realização desta segunda análise utilizou-se também um microcomputador com o software Etholog 2.2 (Ottoni, 2000).

O catálogo comportamental utilizado foi composto pelos seguintes itens:

COMPORTAMENTO	DEFINIÇÃO	PARÂMETROS
Locomoção	O animal realiza uma movimentação corpórea que resulta em um deslocamento no espaço.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Duração = considera-se como locomoção a partir de um passo.</li> </ul>

Espiar	O animal permanece sem se locomover, porém realiza o movimento de arremessar a cabeça, do centro para qualquer direção, precedido de um curto movimento no sentido oposto, e finaliza com o retorno à posição inicial.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração = registra-se o tempo desde que o animal inicia o movimento até o momento que muda de comportamento;</li> <li>• Freqüência = registra-se quando o animal retorna a cabeça a posição inicial.</li> </ul>
Imobilidade corporal com movimentos de cabeça (exceto o espiar)	O animal permanece com o corpo imóvel, porém realiza movimentos angulares de cabeça (rotação, inclinação e flexão/extensão).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração = registra-se o tempo desde que o animal inicia o movimento até o momento que muda de comportamento.</li> </ul>
Imobilidade completa	O animal permanece com o corpo e a cabeça imóvel, apresentando somente movimentos respiratórios e oculares.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração = registra-se o tempo desde que o animal inicia este comportamento até o momento que muda para outro comportamento.</li> </ul>
Auto-limpeza	O animal esfrega o bico ou a pata nas penas do corpo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração = registra-se o tempo desde que o animal inicia o movimento até o momento que muda de comportamento.</li> </ul>
Defecação	O animal expele as fezes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Freqüência = registra-se o número de vezes que o animal expele as fezes.</li> </ul>

#### 4- ETAPA 1: COMPORTAMENTO DE POMBOS EXPOSTOS A UM NOVO AMBIENTE

##### 4.1- Protocolos experimentais

Segundo Feldman e cols. (1997) estudos na área de farmacologia comportamental devem começar pelo estabelecimento de procedimentos e medidas para definir uma taxa de comportamento basal. Portanto, nesta etapa, descrevemos o padrão comportamental de pombos submetidos a um novo ambiente, bem como os efeitos de algumas manipulações nesta situação.

##### a) O comportamento na GN e sua habituação

Para observar os comportamentos do animal quando exposto a uma GN, um grupo de animais experimentalmente ingênuos (N=10), foi exposto à situação acima descrita. Para investigar os efeitos comportamentais da repetição do teste, sete destes animais foram expostos a esta mesma gaiola em três sessões, com um intervalo de sete dias entre as mesmas. Em dois animais, experimentalmente ingênuos, repetiu-se o teste três vezes com um intervalo de dois dias entre as sessões.

b) O comportamento na GN: efeitos da associação com o ruído branco

Estudos com roedores demonstram que a adição de um som de fundo ao teste de campo aberto amplifica a resposta de medo dos animais (Nahas, 1999). Em pombos, a apresentação de um estímulo sonoro produz uma resposta exploratória cuja intensidade e quantidade diminuem rapidamente com a repetição do estímulo (Valentinuzzi e Ferrari, 1997). Com o objetivo de analisar os efeitos da associação do ruído branco (72 dB) à GN, um grupo de animais experimentalmente ingênuos (N=4) foi exposto ao ambiente experimental acima descrito associado ao som de um aparelho de rádio fora de frequências de emissoras locais, em três sessões, com um intervalo de sete dias entre as mesmas.

c) O comportamento na GN fechada

Na gaiola descrita anteriormente o animal tem acesso visual ao ambiente através das grades da gaiola. Os roedores tem uma preferência inata por ambientes fechados, possivelmente porque neste ambiente estariam mais protegidos de um perigo em potencial (Lister, 1990). Com a finalidade de observar se o bloqueio do acesso visual ao ambiente muda o comportamento dos pombos na primeira exposição, um grupo de animais experimentalmente ingênuos (N=8) foi exposto a uma gaiola cujas paredes foram recobertas por plástico preto (gaiola fechada). Com base nos resultados dos experimentos anteriores, observou-se que nos primeiros 10 minutos do teste ocorrem as

alterações comportamentais mais significativas. Desta forma neste protocolo o animal foi exposto ao ambiente experimental somente durante 10 minutos.

d) O comportamento na GN: os efeitos da administração intra-peritoneal de salina

A administração de uma solução salina através de injeção, envolve uma maior manipulação do animal e possivelmente dor, que podem afetar o comportamento do animal (Sanches, 1996; Nahas, 1999). Com a finalidade de examinar se estes procedimentos afetam o comportamento do animal exposto a uma GN, administrou-se 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) por via intra- peritoneal, em um grupo de animais experimentalmente ingênuos (N=10), 30 minutos antes da exposição à nova gaiola, em duas sessões de 10 minutos de duração com um intervalo de sete dias entre as mesmas.

## 5- ETAPA 2: EFEITO DO DIAZEPAM EM POMBOS EXPOSTOS A UMA GN

Segundo Hascoët e cols. (2001) um dos principais critérios para a validação de um modelo animal de ansiedade é a sensibilidade aos benzodiazepínicos. Portanto, nesta etapa analisamos os efeitos comportamentais da administração sistêmica de diazepam ou veículo (via i.p.; em um volume de 1 ml) em pombos expostos a GN.

Nesta etapa, para a melhor visualização dos comportamentos os registros dos experimentos foram realizados com a câmera de vídeo postada a 150 cm acima da grade

superior da gaiola. Deve ser notado que, desta forma o comportamento de defecação não pôde ser analisado.

### 5.1- Drogas

Em um estudo realizado por Kleven e Koek (1999) examinou-se o efeito anti-conflito de uma variedade de agonistas benzodiazepínicos em pombos e comparou-se com a relação entre as potências para produzir o efeito ansiolítico e as doses clínicas em humanos. Neste trabalho, os animais (privados de alimentos) foram mantidos em um esquema múltiplo de reforçamento que alterna componentes sem punição (apresentação da comida) e com punição (apresentação da comida associado a um choque). Observou-se então que as doses de 0,16 , 2,5 e 10 mg/ Kg de peso de diazepam aumentam significativamente a freqüência da resposta punida dos animais (sem afetar a resposta no componente não punido) e a porcentagem de animais que mostram aumento significativo desta resposta em relação ao grupo controle sem droga; esse aumento exibiu a forma de um U invertido dose- dependente. Além disso, essas doses apresentaram uma correlação positiva alta ( $r = 0,90$ ) com as doses efetivas na clínica em humanos.

Utilizamos no presente estudo o diazepam (Roche, Brasil) dissolvido em solução de NaCl (0,9%), nas doses de 0,25 , 0,75 , 2,5 e 7,5 mg/ kg de peso corporal, administrado por via i.p. 30 minutos antes da segunda exposição ao teste.



## 5.2- Protocolo experimental

a) Os efeitos comportamentais da administração sistêmica de diazepam ou veículo na segunda exposição de pombos a uma GN.

Na primeira etapa deste estudo constatou-se que após sete dias da exposição dos animais à GN o padrão comportamental da primeira exposição é mantido, ou seja, não ocorre habituação dos comportamentos registrados na GN. Para evitar que os efeitos da droga fossem confundidos com um desvio de comportamento individual do animal, observou-se a necessidade de um pré- teste, para a definição do padrão comportamental que cada animal realiza quando colocado no ambiente experimental.

Com o objetivo de investigar os efeitos comportamentais da administração sistêmica de diazepam ou veículo na segunda exposição de pombos a uma GN, foram expostos ao ambiente experimental cinco grupos de animais experimentalmente ingênuos. Sete dias após a primeira sessão administrou-se a dose de 0,25 mg/ Kg de peso corporal (N= 7), 0,75 mg/ Kg (N= 6), 2,5 mg/ kg (N=7), 7,5 mg/ Kg (N=10) de diazepam; ou 1 ml de solução salina (0,9%) no grupo controle (N=8) e 30 minutos depois realizou-se o teste. A análise do efeito do diazepam na segunda sessão (S2) foi feita em relação ao comportamento realizado na primeira (S1) exposição ao teste, utilizando a seguinte fórmula: 
$$= (S2 \times 100 / S1) - 100.$$

## 6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados para cada manipulação foram analisados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância (ANOVA de uma ou de duas vias com replicações, de acordo com o desenho experimental), seguidas pelo teste (post hoc) de Duncan. Os dados comportamentais foram submetidos ao teste de Levene, que verificou a homogeneidade de variâncias e a correlação entre médias e variâncias. Os protocolos experimentais que mostraram distribuição diferente da normal e sem homogeneidade significantes foram: 1) Análise do comportamento na GN, o efeito do ruído branco e 2) Os efeitos comportamentais da administração sistêmica de diazepam ou veículo na segunda exposição de pombos a uma GN. Estes protocolos foram analisados por meio de procedimentos não-paramétricos (ANOVA não-paramétrica de uma via de Kruskal-Wallis seguida por comparações entre grupos pelo teste da Mann-Whitney). O nível de significância adotado nesses procedimentos foi  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS**

## ETAPA 1

### a) O comportamento na GN e sua habituação

A atividade mais evidente dos pombos na primeira exposição ao ambiente experimental foi o comportamento de espiar. O animal permanecia sem se locomover, porém realizando o movimento de arremessar a cabeça do centro para qualquer direção, precedido de um curto movimento no sentido oposto, e finalizando com o retorno à posição inicial. Na observação qualitativa de 10 animais expostos pela primeira vez à GN constatou-se que nos primeiros minutos do teste o comportamento de espiar era bastante freqüente e a amplitude do arremesso da cabeça era grande. Ao longo do tempo, estas características pareciam diminuir gradativamente. O comportamento de espiar começava a ser intercalado por períodos em que o animal realizava comportamentos de imobilidade corporal com movimentos de cabeça e a imobilidade completa, que iam aumentando ao longo da sessão. Já a locomoção, a auto-limpeza e a defecação não demonstraram um padrão estável. Todos os animais analisados realizaram os comportamentos de espiar, imobilidade corporal com movimentos de cabeça, locomoção e auto-limpeza; os comportamentos de imobilidade completa e de defecação foram apenas ocasionalmente observados.

Na análise quantitativa do comportamento de espiar, só foi possível estudar a freqüência e a duração deste comportamento, pois ainda dispomos de uma forma de medir a amplitude de movimento da cabeça do animal. Tanto a duração quanto a freqüência do comportamento de espiar sofreram adaptação ao longo dos 30 minutos do teste. A análise de variância da freqüência do espiar demonstrou diferenças significantes

entre os blocos de dois minutos ( $F_{14,135} = 4,79$ ;  $p=0,001$ ), este comportamento era alto ( $65,4 \pm 10,9$  movimentos/ 2 minutos) nos primeiros 2 minutos e gradativamente diminuiu, estabilizando-se no décimo quarto minuto ( $31,4 \pm 8,5$  movimentos/ 2 minutos). Os valores deste último período foram significativamente menores do que os primeiros dois minutos ( $p= 0,002$ ), mas iguais aos últimos dois minutos do teste ( $10,5 \pm 3,7$  movimentos/ 2 minutos;  $p=0,084$ ) (Fig. 2 A). A adaptação foi observada também quando a frequência do espiar era analisada a cada 10 minutos ( $F_{2,27} = 8,72$ ;  $p=0,001$ ), pois a soma dos primeiros 10 minutos ( $269,2 \pm 34,6$  movimentos/ 2 minutos) foi significativamente maior do que o segundo ( $132,1 \pm 26,12$  movimentos/ 2 minutos;  $p=0,002$ ) e o terceiro ( $116,1 \pm 23,49$  movimentos/ 2 minutos;  $p=0,001$ ) blocos de 10 minutos (Fig. 2 B).

O mesmo ocorreu na duração do espiar ( $F_{14,135} = 3,16$ ;  $p=0,001$ ), nos primeiros dois minutos o animal passava em média  $94,4 \pm 6,9$  segundos espiando. A duração deste comportamento ia diminuindo, estabilizando-se à partir do décimo quarto minuto ( $48,6 \pm 13,7s$ ), que era menor que nos primeiros 2 minutos do teste ( $p= 0,015$ ) e igual aos últimos dois minutos ( $35,4 \pm 9,9s$ ) (Fig.2 C). Entretanto na análise em blocos de 10 minutos, as diferenças entre estes blocos não se mostraram estatisticamente significantes. (Fig. 2 D).

O comportamento de imobilidade com movimentos de cabeça também foi modificado ao longo da sessão ( $F_{14,135} = 2,08$ ,  $p=0,016$ ). No entanto em oposição ao comportamento de espiar, este comportamento seguiu um padrão crescente. Nos primeiros dois minutos do teste a duração do comportamento de imobilidade com movimentos de cabeça ( $14,2 \pm 6,6$  segundos) foi significativamente menor ( $p=0,039$ ) do que nos últimos dois minutos de exposição ( $53 \pm 8,4$  segundos) (Fig. 3 A). Além disso, nos primeiros 10 minutos a duração deste comportamento era significativamente menor ( $F_{14,135} = 8,29$ ;  $p=0,001$ ) que o segundo ( $p=0,001$ ) e o terceiro ( $p=0,003$ ) bloco de 10 minutos (Fig. 3 B). A duração da imobilidade completa também tendeu a aumentar, porém não havia diferenças significantes tanto na análise a cada 2 minutos ( $F_{14, 135} = 1,43$ ;  $p=$

0,143) (Fig. 3 C) quanto a cada 10 minutos ( $F_{2,27} = 1,27$   $p = 0,291$ ) (Fig. 3 D). A locomoção e a auto-limpeza não sofreram alterações significantes ao longo da sessão (Fig. 4), e a freqüência de defecação era muito variável em relação ao tempo.

Nas sessões de registro realizadas sete e quatorze dias (sessão 2 e 3, respectivamente) após a primeira exposição do animal ao ambiente experimental, observou-se que o comportamento de espiar (freqüência e duração) manteve o padrão de adaptação da primeira exposição. A análise dos comportamentos em blocos de 2 (freqüência  $F_{28,270} = 0,78$   $p = 0,771$  e duração  $F_{28,270} = 0,67$   $p = 0,883$ , Fig. 5 A e 5 D), 10 (freqüência  $F_{4,54} = 0,30$   $p = 0,873$  e duração  $F_{4,54} = 0,42$   $p = 0,787$ , Fig. 5 B e 5 E) e 30 minutos (freqüência  $F_{2,18} = 1,07$   $p = 0,360$  e duração  $F_{2,18} = 1,01$   $p = 0,382$ , Fig. 5 C e 5 F) não demonstrou diferenças significantes entre as sessões. O mesmo ocorreu com a imobilidade corporal com movimentos de cabeça (2 minutos  $F_{28,270} = 1,01$   $p = 0,442$ ; 10 minutos  $F_{4,54} = 0,80$   $p = 0,528$ ; 30 minutos  $F_{2,18} = 2,54$   $p = 0,106$ ; Fig. 6 A, B e C) e imobilidade completa (2 minutos  $F_{28,270} = 1,14$   $p = 0,283$ ; 10 minutos  $F_{4,54} = 0,82$   $p = 0,512$ ; 30 minutos  $F_{2,18} = 1,40$   $p = 0,270$ ; Fig. 6 D, E e F) mas os padrões temporais destes comportamentos não foram tão estáveis como os do espiar. Portanto, nenhum dos comportamentos analisados sofreu habituação significativa ao teste após sete e quatorze dias da primeira exposição.

Nos animais que foram reexpostos ao teste dois e quatro dias após a primeira exposição não foi realizada a análise estatística devido ao número de animais ser muito pequeno ( $N=2$ ). No entanto neste estudo observou-se, como no grupo anterior, que na primeira sessão os animais sofreram uma adaptação da freqüência do comportamento de espiar ao longo da sessão. Nos primeiros 2 minutos a freqüência era de em média  $96,5 \pm 5,5$  espiar/ 2 minutos e ia gradualmente diminuindo atingindo no último bloco a média de  $23,5 \pm 5,5$  espiar/ 2 minutos. Na segunda e na terceira sessão esta adaptação pareceu não ocorrer (Fig 7 A, B e C). A freqüência nos primeiros dois minutos é de em média  $30 \pm$

**Figura 2 – A freqüência e a duração do comportamento de espiar em pombos (*Columba livia*) expostos pela primeira vez a um novo ambiente.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=10) da freqüência do espiar separados por blocos de 2 minutos (A) (\* p <0,05 em relação aos primeiros 2 minutos), da soma da freqüência do espiar a cada 10 minutos (B) (\* p <0,05 em relação aos primeiros 10 minutos), da duração do espiar separados por blocos de 2 minutos (C) (\* p <0,05 em relação aos primeiros 2 minutos, Análise de variância seguida do Teste de Duncan) e da soma da duração do espiar a cada 10 minutos de exposição a um novo ambiente (D).

**Figura 3 – A duração da imobilidade corporal com movimentos de cabeça e da imobilidade completa em pombos (*Columba livia*) expostos pela primeira vez a um novo ambiente.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=10) da duração da imobilidade com movimentos de cabeça separados por blocos de 2 minutos (A) (\* p <0,05 em relação aos primeiros 2 minutos), da soma da duração da imobilidade com movimentos de cabeça a cada 10 minutos (B) (\* p <0,05 em relação aos primeiros 10 minutos, Análise de variância seguida do Teste de Duncan), da duração da imobilidade completa separados por blocos de 2 minutos (C) e da duração da imobilidade completa a cada 10 minutos de exposição a um novo ambiente (D).



**Figura 4 – A locomoção e a auto-limpeza em pombos (*Columba livia*) expostos pela primeira vez a um novo ambiente.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=10) da locomoção (A) e da auto- limpeza (B) durante 30 minutos (separados por blocos de 2 minutos) de exposição a um novo ambiente.

**Figura 5 –A freqüência e a duração do espiar em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste em três sessões a intervalos de sete dias.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=7) da freqüência e da duração do espiar em blocos de dois (A e D), de dez minutos (B e E) e o total (C e F) da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\triangle$ ) e terceira (O) exposição ao teste.\* p <0,05 em relação aos primeiros 10 minutos (Análise de variância seguida do Teste de Duncan).

**Figura 6 – A imobilidade corporal com movimentos de cabeça e a imobilidade completa em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste em três sessões a intervalos de sete dias.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=7) da imobilidade corporal com movimentos de cabeça e da imobilidade completa em blocos de dois (A e D), de dez minutos (B e E) e o total (C e F) da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\Delta$ ) e terceira (O) exposição ao teste. .\* p <0,05 em relação aos primeiros 10 minutos (Análise de variância seguida do Teste de Duncan).

**Figura 7 –A freqüência e a duração do espiar em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste em três sessões a intervalos de dois dias.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=2) da freqüência do espiar em blocos de dois (A), de dez minutos (B) e o total (C) da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\triangle$ ) e terceira ( $\circ$ ) exposição ao teste.

15 na segunda sessão e de  $42 \pm 4$  na terceira. Nestas sessões, a frequência do espiar pareceu ser mais baixa no primeiro bloco de 2 minutos do que na primeira exposição, mantendo-se este comportamento praticamente no mesmo patamar ao longo da sessão, sugerindo forte habituação de um registro para o outro.

Da mesma forma, na análise em blocos de 10 minutos da frequência de espiar, observou-se que nos 10 primeiros minutos da primeira sessão a frequência era de em média  $304 \pm 5$ , enquanto que neste mesmo bloco a frequência na segunda sessão foi em média  $92,5 \pm 21,5$  e na terceira  $91 \pm 25$ . Além disso a soma da frequência total de cada sessão, reforçou as análises anteriores, pois o total da primeira sessão foi em média  $543 \pm 78$  espiar/ 2 minutos, enquanto que na segunda sessão foi de  $168 \pm 77$  e na terceira  $163,5 \pm 47,5$  espiar/ 2 minutos. Portanto a frequência de espiar pareceu sofrer habituação ao teste quando este era realizado com intervalos de dois dias. Em relação a duração do espiar, esta habituação não foi tão clara. Os comportamentos de imobilidade corporal com movimentos de cabeça, a imobilidade completa, a locomoção e a auto-limpeza foram bastante variáveis em todas as sessões, parecendo não sofrer habituação entre as mesmas.

b) O comportamento na GN: efeitos da associação com um ruído branco.

Neste protocolo, a frequência de espiar não sofreu adaptação ao longo do teste, e o mesmo ocorreu na segunda e terceira exposições (Fig. 8 A e B). Este comportamento também não demonstrou habituação entre as sessões (Fig. 8 C). A comparação deste protocolo experimental (com som) com os resultados do protocolo anterior (que não

incluía o ruído branco, sem som) demonstrou que a associação do som tendeu a diminuir a frequência do espiar nos primeiros 10 minutos, acarretando numa diferença no padrão de adaptação deste comportamento. No entanto o mesmo não apresentou diferenças significantes entre os dois protocolos nos blocos de 10 minutos na primeira ( $H_{1,11}=2,89$ ;  $p=0,080$ ), na segunda ( $H_{1,11}=2,28$ ;  $p=0,130$ ) e na terceira sessão ( $H_{1,11}=1,75$ ;  $p=0,185$ ) (Fig. 9 A).

A adaptação da duração do espiar (Fig. 8 D, E e F), do comportamento de imobilidade corporal com movimentos de cabeça, da imobilidade completa e da auto-limpeza não foi observada ao longo do teste em nenhuma das sessões e nem habituação entre as mesmas. Estes comportamentos não foram significativamente diferentes dos observados no protocolo experimental que não incluía a associação do ruído branco (sem som) na primeira, segunda e terceira sessão e entre o total das sessões (Fig. 9 B e C, 10 A e C).

Neste protocolo, a duração da locomoção não demonstrou adaptação ao longo da sessão, nem habituação entre as sessões. Entretanto, a locomoção nos primeiros 10 minutos da primeira e terceira sessões foi menor ( $H_{1,11}=4,34$ ;  $p=0,037$  e  $H_{1,11}=3,95$ ;  $p=0,046$  respectivamente) em relação aos mesmos períodos no protocolo sem som. Portanto a associação do ruído branco diminuiu a duração da locomoção nos primeiros 10 minutos da primeira e da terceira sessão (Fig. 10 B).

### c) O comportamento na GN fechada

Quando os animais foram expostos a uma gaiola cuja as paredes foram recobertas por plástico preto (fechada) por um período de 10 minutos, observou-se um padrão de

pouca adaptação dos comportamentos ao longo deste período, semelhante aos animais expostos à GN aberta. Na análise do total dos blocos a frequência do espiar na gaiola aberta e na fechada não demonstrou diferenças significantes primeira ( $F_{1,106}=0,09$ ;  $p=0,760$ ), embora a duração do espiar na GN aberta tendeu a ser maior do que na gaiola fechada ( $F_{1,106}=3,35$ ;  $p=0,069$ ) (Fig. 11 A e B).

Na análise da soma dos blocos da duração da imobilidade corporal com movimentos de cabeça observou-se que os animais expostos a gaiola fechada gastavam mais tempo realizando este comportamento do que os expostos a gaiola aberta ( $F_{1,16}=7,37$ ;  $p=0,015$ ) (Fig. 11 C). Os demais comportamentos não sofreram alterações ao longo do tempo nem apresentaram diferenças dos animais expostos à gaiola aberta. Em resumo a restrição visual imposta pela gaiola fechada aumentou significativamente a duração total do comportamento de imobilidade corporal com movimentos de cabeça, sem afetar os demais comportamentos analisados.

#### d) O comportamento na GN: os efeitos da administração intra-peritoneal de salina

A exposição por 10 minutos de pombos (N=10) à GN após a administração da solução salina não apresentou diferenças significantes em nenhum comportamento entre a primeira e segunda sessão. As médias da frequência do espiar, da imobilidade completa, da duração da locomoção e da duração da auto-limpeza não demonstraram diferenças estatisticamente significantes nas duas sessões em relação ao grupo controle (Fig. 12 A, D, E e F). Entretanto, a duração do espiar no grupo salina foi menor na primeira ( $p=0,008$ ) e na segunda sessão ( $p=0,021$ ) em relação ao grupo controle (Fig. 12 B), enquanto o oposto ocorreu na duração da imobilidade corporal com movimentos de

cabeça, que foi maior no grupo salina do que no controle em ambas as sessões (1º:  $p=0,001$  e 2º:  $p=0,006$ ) (Fig. 12 C). Portanto a administração de salina parece reduzir ocorrência do comportamento de espiar e aumentar a imobilidade corporal com movimentos de cabeça.

## ETAPA 2

a) Os efeitos comportamentais da administração periférica de Diazepam ou veículo na segunda exposição de pombos à GN.

O teste de Kruskal- Wallis indicou que nenhum comportamento demonstrou diferenças significantes entre a primeira e a segunda sessão, tanto no grupo controle, como nos grupos em que foram administrados as doses de 0,25 e 0,75 mg/ Kg de peso de diazepam. No grupo em que foi administrada a dose de 2,5 mg/Kg de diazepam antes da segunda sessão, a frequência ( $H_{1,12}=5,02$ ;  $p=0,025$ ) e a duração ( $H_{1,12}=6,56$ ;  $p=0,010$ ) do espiar e a duração da locomoção ( $H_{1,12}=4,68$ ;  $p=0,030$ ) diminuíram, enquanto que a imobilidade completa ( $H_{1,12}=4,16$ ;  $p=0,041$ ) aumentou em relação ao observado na primeira exposição (sem qualquer injeção). No grupo que recebeu a maior dose (7,5 mg/Kg) a frequência ( $H_{1,20}=7,47$ ;  $p=0,006$ ) e a duração ( $H_{1,20}=8,59$ ;  $p=0,003$ ) do espiar e a duração da imobilidade com movimentos de cabeça ( $H_{1,20}=7,00$ ;  $p=0,008$ ) diminuíram enquanto que a imobilidade completa aumentou ( $H_{1,20}=11,54$ ;  $p=0,001$ ), sugerindo que os comportamentos realizados na GN sejam sensíveis somente as doses 2,5 e 7,5 mg/Kg de peso corporal de diazepam.



**Figura 8 –A frequência e a duração do espiar em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste associado a um ruído branco em três sessões a intervalos de sete dias. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=4) da frequência e da duração do espiar em blocos de dois (A e D), de dez minutos (B e E) e o total (C e F) da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\triangle$ ) e terceira ( $\circ$ ) exposição ao teste associado a um ruído branco.**

**Figura 9– A freqüência e duração do espiar e a imobilidade corporal com movimentos de cabeça em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste e este associado a um ruído branco em três sessões a intervalos de sete dias.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=4) em blocos de dez minutos e o total da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\triangle$ ) e terceira ( $\circ$ ) exposição ao teste (sem som) e este associado a um ruído branco (com som) da freqüência do espiar (A), da duração do espiar (B) e da imobilidade corporal com movimentos de cabeça (C).

**Figura 10 – A imobilidade completa, a locomoção e a auto-limpeza em pombos (*Columba livia*) expostos ao teste e este associado a um ruído branco em três sessões a intervalos de sete dias.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM (n=4) em blocos de dez minutos e o total da primeira ( $\square$ ), segunda ( $\Delta$ ) e terceira ( $\circ$ ) exposição ao teste (sem som) e este associado a um ruído branco (com som) da imobilidade completa (A), da locomoção (B) e da auto-limpeza (C). . \*  $p < 0,05$  em relação aos primeiros 10 minutos da primeira e terceira sessão do protocolo com som (Kruskal-Wallis).

**Figura 11 –A frequência e duração do espiar e a duração da imobilidade corporal com movimentos de cabeça em pombos (*Columba livia*) expostos a gaiola aberta ou a fechada.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de animais expostos a gaiola aberta (n=10) ou a gaiola fechada (N=8) em blocos de dois minutos e a soma total dos blocos da frequência (A) e da duração (B) do espiar e da imobilidade corporal com movimentos de cabeça (C). \*  $p < 0,05$  em relação ao total da gaiola aberta (Análise de variância).

**Figura 12 –O comportamento de pombos (*Columba livia*) expostos à GN após a administração de salina.** As barras representam a média  $\pm$  EPM da frequência (A) e da duração (B) do espiar, da imobilidade corporal com movimentos de cabeça (C), da imobilidade completa (D), da duração da locomoção (E) e da duração da auto-limpeza (F) de animais expostos à GN após a administração intra-peritonial de 1ml de salina (n=10) e o grupo controle (N=7) que foi somente exposto à GN, na primeira sessão (S1) e na segunda sessão (S2). \* p <0,05 em relação à mesma sessão no grupo salina (Análise de variância seguida do teste de Duncan).

Comparamos também os valores dos  $\Delta$  (onde  $\Delta=(S2 \times 100/ S1)-100$ , ver materiais e métodos) de cada grupo com o grupo em que foi administrado o veículo. O teste de Kruskal- Wallis indicou que a duração da imobilidade completa ( $H_{4,38}=19,70$ ;  $p=0,001$ ) foi o único comportamento que demonstrou diferenças significantes entre os grupos. Somente as duas doses mais altas de diazepam aumentaram significantemente (2,5 mg/Kg:  $p=0,008$  e 7,5 mg/Kg:  $p=0,004$ ) a imobilidade completa em relação ao grupo controle (Fig. 13).

Na análise qualitativa dos comportamentos, chamou a atenção o fato de que imediatamente após a administração da dose mais alta de diazepam, quando os animais foram recolocados em suas gaiolas-residência, eles demonstraram dificuldade de locomoção e sonolência (a cabeça permaneceu fletida e apoiada sobre o peito, com o pescoço retraído e o movimento de piscar os olhos era lento). Estes comportamentos se mantiveram durante os trinta minutos que antecederam o teste. De forma notável quando estes animais foram reexpostos à GN a dificuldade de locomoção e a sonolência não foram observados.

**Figura 13- O efeito do diazepam em pombos expostos à GN.** O eixo Y apresenta o valor de  $\frac{(S2 \times 100)}{S1} - 100$ , os pontos representam a média do  $\pm$  EPM da frequência do espirar (A), da duração do espirar (B), da duração da imobilidade corporal com movimentos de cabeça (C), da duração da imobilidade completa (D), da duração da locomoção (E) e da duração da auto-limpeza em um grupo de pombos que recebeu 1 ml de solução salina (N=8) ou diazepam nas doses de 0.25 (N=7), 0.75 (N=6), 2.5 (N=7) ou 7.5 (N=10) e expostos à GN. \* p <0,05 em relação ao veículo (Análise de variância seguida do Teste de Duncan).

**DISCUSSÃO**



Para o desenvolvimento de um modelo animal de ansiedade, uma questão essencial é que medidas devemos considerar como indicadores do medo. Os modelos tradicionais, a maior parte com roedores, geralmente utilizam o comportamento exploratório como índice de ansiedade (Lister, 1990; Palanza, 2001). Na exposição de pombos a uma gaiola nova (GN), independente do protocolo ou da sessão os animais permaneceram a maior parte do tempo do teste sem se locomover. Dessa forma, no presente trabalho, a atividade exploratória de pombos foi caracterizada por movimentos de cabeça: o espiar (movimentos balísticos) ou movimentos angulares (flexão, extensão, inclinação e rotação). Na primeira exposição de pombos a uma GN semelhante à gaiola residência e localizada numa sala ao abrigo de sons e de acesso visual aos outros animais, o espiar foi o comportamento mais freqüente, e este comportamento sofreu adaptação, diminuindo ao longo dos 30 minutos de exposição. A imobilidade corporal com movimentos de cabeça demonstrou um padrão oposto ao espiar, aumentando ao longo da sessão. Podemos, então, sugerir que este último comportamento e o espiar refletem a intensidade da atividade exploratória. O espiar, que é um movimento amplo da cabeça demonstraria uma exploração intensa, enquanto que a imobilidade com movimentos de cabeça (movimentos mais discretos) uma diminuição da exploração culminando no aumento da incidência de períodos de imobilidade completa.

Um dos testes utilizados para a seleção de drogas ansiolíticas é o teste de campo aberto. Este aparato consiste em uma área aberta nova cuja fuga é impedida por paredes circundantes (Nahas, 1999; Choleris e cols., 2001). Assim, podemos considerar o teste desenvolvido neste estudo como uma forma de campo aberto. Como este teste envolve a captura do animal, uma breve restrição dos movimentos, o súbito isolamento e a exposição à novidade, fatores que podem provocar medo (Faure e cols., 1983; Mills e cols., 1993; Jones e cols., 1999a; Nahas, 1999; Clarke e Jones, 2000; Wall e Messier, 2001) poderíamos sugerir que o espiar seria um bom índice de ansiedade. Deste modo,

os animais exploram o ambiente ou se tornam ativos, porque estariam amedrontados e com a exploração continuada, somada à ausência de outras mudanças ambientais contingentes, o medo diminui. O mesmo ocorreu em camundongos expostos ao campo aberto por trinta minutos, onde os comportamentos motivados por medo e/ ou ansiedade foram altos durante os primeiros 10 minutos do teste, quando a tigmotaxia e a avaliação de risco foram muito altas. O último, por sua vez, assim como o espiar, começou alto e claramente declinou com o tempo (Choleris e cols., 2001). No entanto, em galinhas e codornas o medo aumentado é associado com o congelamento, silêncio e inatividade no campo aberto (Faure e cols., 1983; Jones e cols., 1991; Jones e Roper, 1997; Marín e cols., 1997; Nahas, 1999), sugerindo que os comportamentos de restabelecimento social e exploração só podem ser expressados quando os efeitos inibitórios do medo diminuem suficientemente (Faure e cols., 1983; Mills e cols., 1993; Jones e cols., 1999b).

No registro realizado sete e quatorze dias após o primeiro teste, o animal manteve o mesmo padrão comportamental da primeira exposição, sugerindo que após este período o ambiente voltou a ser “novo” para o animal. Quando o intervalo entre as sessões foi de dois dias a frequência de espiar pareceu sofrer habituação na segunda e terceira sessões, sugerindo que uma semana pode ser tempo suficiente para o animal “esquecer” o primeiro teste, ou ainda, que o teste não foi suficientemente estressante ou relevante para ser consolidado na memória.

Um estudo com camundongos no labirinto em cruz elevado (LCE), mostrou que em re-exposições feitas após 7 e 14 dias, os comportamentos exploratórios e locomotores assim como o farejar, o ficar em pé, as entradas nos braços fechados, e o total de entradas nos braços (abertos e fechados) permaneceram no mesmo patamar observado na primeira exposição ao teste. Portanto estes comportamentos não habituaram com a repetição do mesmo. No entanto, a postura de alongamento atento (SAP), a inclinação da cabeça (head- dipping), ambos na área aberta e as entradas na área aberta, diminuem

com a repetição do teste, indicando que o nível de ansiedade aumentou progressivamente com a repetição das exposições (Espejo, 1997). Estes dados podem sugerir que os comportamentos analisados no presente estudo refletem atividade locomotora e/ ou exploratória, e não comportamentos defensivos ou provocados por medo.

A associação de um ruído branco à GN, demonstrou uma tendência a diminuir o espiar em todas as sessões, principalmente nos primeiros 10 minutos de exposição, alterando o padrão de adaptação deste comportamento, que ocorria sem a associação deste estímulo, ou seja, a diferença que havia entre os blocos de 10 minutos desapareceu com a associação do som. A duração da locomoção diminuiu significativamente nos primeiros 10 minutos da primeira e na terceira sessão. Portanto, a apresentação deste possível estímulo aversivo, o som, poderia gerar medo e suprimir a atividade exploratória em todas as sessões. No entanto, em um outro estudo com pombos, a apresentação de um estímulo sonoro de 83-85 dB durante 1 segundo, a cada 30 segundos de intervalo, produziu uma resposta exploratória intensa, que consistiu em orientação para diferentes pontos através da rotação da cabeça, extensão do pescoço, fixação ou alerta. Neste estudo, a intensidade e a quantidade destes comportamentos diminuíram rapidamente com a repetição do estímulo (Valentinuzzi e Ferrari, 1997).

Quando a GN teve suas paredes recobertas por um plástico preto impedindo o acesso visual da sala de experimento, os animais permaneceram mais tempo em imobilidade corporal com movimentos de cabeça do que os expostos a uma GN aberta. Quanto a roedores sabe-se que estes preferem ambientes escuros e fechados (Holmes e cols., 2001; Hascoët e cols., 2001; Bourin e Hascoët, 2002). Estudos com aves, galinhas e codornas, sugerem que estes animais também têm esta preferência (Jones e cols., 1991; Jones e cols., 1999b). No entanto, em relação aos pombos não conhecemos estudos semelhantes. Além disso, o pombo, ao contrário das galinhas e das codornas, é

um animal voador, sugerindo que o seu comportamento de defesa diante de um predador (especialmente os terrestres) seria voar, neste caso um ambiente aberto seria menos ameaçador do que um fechado. Dessa forma, fechar a GN aumentaria o nível de estresse imposto pelo teste, e então este aumento do medo poderia suprimir a exploração, substituindo um comportamento que reflete uma atividade exploratória intensa, como o espiar, por um de menor intensidade, a imobilidade corporal com movimentos de cabeça. Por outro lado, o aumento da imobilidade corporal com movimentos de cabeça poderia ser resultado da “pobreza” do aparato. O teste de campo aberto tem sido criticado, por ser um aparato “pobre” que não estimula a atividade exploratória (Genaro e Schmidek, 2000). Deste modo, o impedimento do acesso visual ao ambiente através do fechamento das paredes circundantes da GN pode tornar o ambiente experimental ainda mais “pobre”, não sendo suficientemente aversivo, fazendo com que a atividade exploratória diminua.

Os animais que receberam, por via intra-peritoneal, 1 ml de solução salina e 30 minutos depois foram expostos à GN, demonstraram também uma diminuição da duração do espiar e um aumento da imobilidade corporal com movimentos de cabeça, em relação aos animais do grupo controle. Assim, os protocolos que envolveram manipulações dos animais ou do ambiente (o ruído branco, o fechamento da gaiola e a administração de salina) pareceram aumentar o comportamento de imobilidade corporal com movimentos de cabeça e tenderam a diminuir o espiar, sugerindo que todas estas manipulações podem aumentar o componente aversivo do teste, diminuindo comportamentos exploratórios.

A segunda etapa deste estudo envolveu a administração do diazepam, com a finalidade de esclarecer se os comportamentos observados na GN seriam motivados pelo medo. A comparação dos comportamentos realizados na primeira e na segunda sessão demonstrou que somente as doses mais altas de diazepam (2,5 e 7,5 mg/Kg de peso corporal) afetaram os comportamentos da segunda exposição. A análise do  $\Delta$ , que

permitiu verificar a diferença relativa entre a segunda sessão e a primeira, além de comparar esta diferença com o grupo em que foi administrado o veículo, indicou que este teste só é sensível à doses mais altas e que o único comportamento afetado foi a imobilidade completa, que aumentou em relação ao grupo controle.

Os dados da etapa anterior sugeriram que o medo inibe a atividade exploratória no pombo. Desta forma, um possível efeito de doses ansiolíticas de diazepam deveria ser a reversão da inibição destes comportamentos. Neste teste, isto poderia ser representado por um aumento da atividade exploratória, o que não ocorreu com nenhuma dose administrada de diazepam.

Por outro lado, poderíamos supor que este aumento da imobilidade completa seria um efeito “ansiolítico” das doses mais altas de diazepam. Isto poderia ser verdade se a imobilidade aumentada representasse uma ocorrência mais precoce da fase de adaptação à GN, já que ao longo do tempo do teste a imobilidade aumenta e no final deste período supostamente o animal está com um nível menor de medo. Entretanto, no presente estudo, esta proposta do aumento da imobilidade como índice de efeito ansiolítico pode ser negada pela análise qualitativa do comportamento logo após a administração da dose mais alta, que indicou claramente efeitos sedativos (sugerindo que o aumento da imobilidade possa ser devido a tais efeitos). Efeito semelhante ocorreu no estudo do Rager e colaboradores (1986) com pintainhos, que examinou os efeitos do clordiazepóxido (uma droga que atua sobre o receptor BZD) na imobilidade tônica (considerada como uma resposta inata de medo). As doses de 5, 10 e 20 mg/ Kg de peso corporal desta droga produziram um paradoxal aumento dose-dependente na duração da imobilidade tônica e um significativo aumento no limiar de eletro-choque para reverter este comportamento. Estes resultados foram independentes do efeito sedativo e/ou relaxante muscular da droga, pois esta não induziu maior inatividade, ataxia, queda da cabeça ou da postura, fechamento dos olhos ou perda do padrão vertical.

Além disso, o espiar, que parece ser uma resposta à novidade do ambiente (pois diminui a medida que o animal se adapta ao mesmo) e que lembra a avaliação de risco realizada por roedores em situações de conflito, não foi afetado por nenhuma dose de diazepam. Isto sugere que esta resposta não foi desencadeada por um processo vinculado a mecanismos de comportamento defensivo (ou ao medo) mas a mecanismos relacionados a outros domínios funcionais (curiosidade, exploração, atenção, alerta, etc.).

Vale notar que as doses de diazepam utilizadas no presente estudo (0,25 , 0,75 , 2,5 e 7,5 mg/ Kg de peso corporal) estão na mesma faixa das doses (0,16 , 2,5 e 10 mg/kg) que demonstraram efeitos “ansiolíticos” (aumento da resposta punida) e não sedativos (não afeta a resposta não punida) no modelo condicionado com pombos realizado por Kleven e Koek (1999). Em pintainhos no campo aberto, doses semelhantes de diazepam (0.05, 0.1, 0.2 mg/ Kg) não afetaram a latência para a deambulação, a atividade locomotora (número de quadrados cruzados), o número de tentativas de fuga do aparato (pulos) e o número de defecações, enquanto que as doses de 0.5 e 1 mg/ Kg induziram claramente a efeitos sedativos (aumentou a latência para deambular e diminuiu o número de tentativas de fuga e a defecação) (Marín e cols., 1997). Portanto, a observação de comportamentos espontâneos em pombos e galinhas pode ser mais sensível em revelar efeitos sedativos dos BZDs, detectando-os em doses mais baixas que aquelas apontadas pelos métodos operantes. Por outro lado, o ambiente da GN poderia recrutar níveis mais baixos de atividade geral ou motivação se comparado ao modelo condicionado. Neste caso, efeitos ansiolíticos não poderiam ser detectados (já que não há um grande componente de medo a ser afetado pelos ansiolíticos) e os efeitos sedativos o seriam em doses mais baixas. Em resumo, nenhum comportamento analisado na GN, inclusive o espiar, parece ser desencadeado pelo medo. Parece, então, importante investigar outras manipulações ambientais em pombos que gerem comportamentos espontâneos que reflitam medo e/ou conflito neste animal.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDREWS, J.S., BROEKKAMP, C.L.E. Procedures to identify anxiolytic or anxiogenic agents. In: HARREN, V., editor, *Methods in Behavioral Pharmacology*, Elsevier Science Publishers, p.37-52, 1993.

BARRET, J.E., BRADY, L.S., WITKIN, J.M. Behavioral studies with anxiolytic drugs. I. Interactions of the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 (flumazenil) with chlordiazepoxide, pentobarbital and ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223:554-559, 1985.

BARRET, J.E., WITKIN, R.S., MANSBACH, P., SKOLNICK, P., WEISSMAN, B.A. Behavioral studies with anxiolytic drugs. III. Antipunishment actions of buspirone in the pigeon do not involve benzodiazepine receptor mechanisms. *The Journal of Pharmacol. and Exp. Ther.*, vol. 238, n. 3, p.1009-1013, 1986.

BARRET, J.E., WITKIN, J.M. Buspirone in animal models of anxiety. In: *Buspirone: mechanisms and clinical aspects*. New York: Academic Press, p. 37-79, 1991.

BARRET, J.E. Studies on the effects of 5-HT<sub>1A</sub> drugs in the pigeon. *Drug. Dev. Res.*, n.26, p.299-317, 1992.

BARRET, J.E., VANOVER, K.E. 5HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions. *Psychopharmacology*, n.112, p.1-12, 1993.

BARRETT, J.E., ZHANG, L., GLEESON, S., GAMBLE, E.H. Anxiolytic and antidepressant mechanisms of 5-HT<sub>1A</sub> drugs in the pigeon: contributions from behavioral studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 18, n.1, p.73-83, 1994.

BARRET, J.E., MICZEK, K.A. Behavioral techniques in preclinical neuropsychopharmacology research. In: BLOOM, F.E., KUPFER, D.J., *Psychopharmacology*, New York: Raven Press, 1995.

BELL, R., HOBSON, H. 5-HT-1a receptor influences on rodent social and agonistic behavior: a review and empirical study. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, n.18, p.325-338, 1994.

BLANCHARD, R.J., YUDKO, E.B., RODGERS, R.G., BLANCHARD, D.C. Defence system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain. Res.*, n.58, p.155-165, 1993.

BLANCHARD, D.C., GRIEBEL, G., BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur. J. Pharmacol.*, n.463, p.97-116, 2003.

BOURIN, M., HASCÖET, M. The mouse light/ dark box test. *Eur. J. Pharmacol.*, n.463, p.55-65, 2003.



CARLI, M., PRONTERA, C., SAMANIN, R. Evidence that central 5-hydroxytryptamine neurones are involved in the anxiolytic activity of buspirone. *Br. J. Pharmacol.*, n.96, p.829-836, 1989.

CHERUBINI, E., CONTI, F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends. Neurosci.*, n.24, p.155-162, 2001.

CHOLERIS, E., THOMAS, A.W., KAVALIERS, M., PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n.25, p.235-260, 2001.

CLARKE, C.H., JONES, R.B. Effects of prior video stimulation on open- field behaviour in domestic chicks. *Applied Animal Behaviour Science*, n. 66, p.107-117, 2000.

COOPER, S.J., POSADAS-ANDREWS, A. Food and water intake in the non-deprived pigeon after chlordiazepoxide administration. *Psychopharmacology*, n.65, p.99-101,1979.

COSTALL, B., KELLY, M.E., NAYLOR, R.J., ONAIVI, E.S. Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.*, n.40, p.494-500, 1988.

COSTALL, B., JONES, B.J., KELLY, M.E., NAYLOR, R.J., TOMKINS, D.M. Exploration of mice in a black and white box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*,n.32, p.777-785, 1989.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, n.15, p.695-699, 1981.

DAWSON, G.R., TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Current Techniques*, vol.16, p.33-36, 1995.

DE VRY, J. 5-HT-1A receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacol.*, n.121, p.1-26, 1995.

DIAGNOSTIC AND STATISTIC MANUAL OF MENTAL DISORDERS. 4<sup>th</sup> ed. Washigton,DC: American Psychiatric Association, 1994.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav. Brain Res.*, n.3597, p.1-10, 2003.

ESPEJO, E.F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav. Brain Res.*, n.87, p.233-238, 1997.

FAURE, J.M., JONES, R.B., BESSEI, W. fear and social motivation as factors in open-field behaviour of the domestic chick. *Biology of Behaviour*, n.8, p.103-116, 1983.

FELDMAN, R.S., MEYER, J.S., QUENZER,L.F.*Principles of neuropsychopharmacology*. Massachusetts: Sinauer Associates, p.57-73, 1997.

FELTENSTEIN, M.W., WARNICK, J.E., GUTH, A.N., SUFKA, K.J. The chick separation stress paradigm: a validation study. *Pharmacol. Biochem. And Behav.*, n.77, p.221-226.

FILE, S.E., GONZALEZ, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1a</sub>- receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, n.54, p.123-128, 1996.

GENARO, G., SCHMIDEK, W.R. Exploratory activity of rats in three different environments. *Ethology.*, n.106, p.849-859, 2000.

GEYER, M.A. Approaches to the characterization of drug effects on locomotor activity in rodents. In: *Modern Methods in Pharmacology*, vol. 6, Willey- Liss, p.81-99, 1990.

GONZALEZ, L.E., ANDREWS, N., FILE, S.E. 5-HT<sub>1a</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze test. *Brain Res.*, n.732, p.145-153, 1996.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine- interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol. Ther.*, vol.65, n.3, p.319-395, 1995.

GRIEBEL, G., BLANCHARD, D.C., JUNG, A., LEE, J.C., MASSUDA, C.K., BLANCHARD, R.J. Further evidence that the mouse defence test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprozalam. *Neuropharmacology*, n.34, p.1625-1633, 1995.

GRIEBEL, G. Variability in the effects of 5HT related compounds in experimental models of anxiety: evidence for multiple mechanisms of 5HT in anxiety ou never ending story? *Pol. J. Pharmacol.*, n.48, p.129-136, 1996.

GRIEBEL, G., RODGERS, R.J., PERRAULT, G., SANGER, D.J. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. And Behav.*, vol.57, n.4, p.817-827, 1997.

HANDLEY, S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. *CNS Drugs*, n.2, p.397-414, 1994.

HASCOËT, M.; BOURIN, M. A new approach to the light/ dark procedure in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, n.60, p.645-653, 1998.

HASCOËT, M., BOURIN, M., DHONNCHADHA, N. The mouse light-dark paradigm: A review. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.*, n.25, p.141-166, 2001.

HIGGS, G.A., BRADBURY, A.J., JONES, B.J., OAKLEY, N.R. Behavioural and biochemical consequences following activation of the 5-HT<sub>1</sub>- like and GABA receptors in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Neuropharmacology*, n.27, p.993-1001, 1988.

HODGES, H., GREEN, S., GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology*, n.92, p.491-504, 1987.

HOLMES, A., ILES, J.P., MAYELL, S.J., RODGERS, R.J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. *Behavioural Brain Research*, n.122, p.159-167, 2001.

IMAIZUME, M., MIYAZAKI, S., ONODERS, K. Effects of xanthine derivatives in a light/ dark test in mice and contribution adenosine receptors. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, n.16, p.639-644, 1994 a.

IMAIZUME, M., SUZUKI, T., MACHIDA, H., ONODERA, K. A fully automated apparatus for a light/ dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Jpn. J. Psychopharmacol.*, n.14, p.83-91, 1994 b.

JONES, R.B., MILLS, A.D., FAURE, J.M. Genetic and experiential manipulation of fear-related behavior in japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Comparative Psychology.*, vol.105, n.1, p.15-24, 1991.

JONES, R.B., ROPER, T.J. Olfaction in the domestic fowl: A critical review. *Physiology & Behavior*, vol.65, n.5, p.1009-1018, 1997.

JONES, R.B., MARIN, R.H., GARCIA, D.A., ARCE, A. T-maze behaviour in domestic chicks: a search for underlying variables. *Animal Behaviour*, n.58, 211-217, 1999a.

JONES, R.B., SATTERLEE, D.G., CADD, G.G. Timidity in Japanese Quail: Effects of vitamin C and divergent selection for adrenocortical response. *Physiology & Behavior*, vol.67, n.1, p.117-120, 1999b.

JONES, R.B., BLACKBURN, T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, n.71, p.555-568, 2002.

KAVALIERS, M., OSSENKOPP, K.P. Measuring anxiety in animal models: an introduction to the symposium. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n.25, p.203-204, 2001.

KLEVEN, M.S., KOEK, W. Pharmacological characterization of in vivo properties of putative mixed 5-HT<sub>1A</sub> agonist/5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist anxiolytics. I. Antipunishment effects in the pigeon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol.276, n.2, p.388-97, 1996.

KLEVEN, M.S., KOEK, W. Effects of different classes of partial benzodiazepine agonists on punished and unpunished responding in pigeons. *Psychopharmacology*, n.144, p.405-410, 1999 a.

KLEVEN, M.S., KOEK, W. Effects benzodiazepine agonists on punished responding in pigeons and their relationships with clinical doses in humans. *Psychopharmacology*, n.141, p.206-212, 1999 b.

KLINT, T. Effects of 8OH-DPAT and buspirone in a passive avoidance test and in the elevated plus-maze test in rats. *Behav. Pharmacol.*, n.2, p.481-489, 1991.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.*, vol.46, p.321-340, 1990.

LOPEZ-RUBALCAVA, C., SALDIVAR, A., FERNANDEZ-GUASTI, A. Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, n.43, p.433-440, 1992.

MANSBACH, R.S., BARRET, J.E. Discriminative stimulus properties of buspirone in the pigeon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, n.240, p.364-369, 1987.

MCMILLAN, D.E. The pigeon as a model for comparative behavioral pharmacology and toxicology. *Neurotoxicology and Teratology*, vol.12, p.523-529, 1990.

MARIN, R.H., MARTIJENA, I.D., ARCE, A. Effect of diazepam and a  $\beta$ - carboline o open-field and T- maze behaviors in 2- day- old chicks. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.*, vol.58, n.4, p.915-921, 1997.

MENARD, J., TREIT, D. Effects of administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n.23, p.591-613, 1999.

MICZEK, K.A., WEERTS, E.M., DEBOLD, J.F., VATNE, T. Agression, anxiety and vocalizations in animals GABA-A and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology*, n.107, p.551-563, 1992.

MILLAN, M.J. The Neurobiology And Control Of Anxious States. *Progress in Neurobiology*, n.70, p.83-244, 2003.

MILLS, A.D., JONES, R.B., FAURE, J.M., WILLIAMS, J.B. Response to isolation in japonese quail genetically selected for high or low sociality. *Physiology and Behavior*. 53:183-189. (1993).

MODY, I. Distinguishing between GABA<sub>A</sub> receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem. Res.*, n.26, p.907-913, 2001.

MILLS, A.D., JONES, R.B., FAURE, J.M., WILLIAMS, J.B. Responses to isolation in japonese quail genetically selected for high or low sociality. *Physiology & Behavior*, vol.53, p.183-189, 1993.

NAHAS, T.R. O teste do campo aberto. In: XAVIER, G.F. *Técnicas para o estudo do sistema nervoso*. São Paulo: Plêiade, p.197-215, 1999.

ONAVI, E.S., MARTIN, B.R. Neuropharmacological and physiological validation of a computer- controlled two compartment black and white box for the assessment of anxiety. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, n.13, p.963-976, 1989.

OTTONI, E.B. Etholog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers*, n.32, p.446-449, 2000.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.*, n.2, p.219-233, 2001.

Pesold, C., Treit, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.*, n.638, p.295-301, 1994.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, n.14, p.149-167, 1985.

PRATT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol. Ther.*, n.55, p.149-181, 1992.

PRUT, L., BELZANG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, n.463, p.3-33, 2003.

RAGER, D.R., GALLUP JR., G.G., BECKSTEAD, J.W. Chlordiazepoxide and tonic immobility: A paradoxical enhancement. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol.25, p.1237-1243, 1986.

RAMOS, A., MORMEDE, O. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, n.22, p.33-57, 1998.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M. *Farmacologia*, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REX, A., VOIGT, J.P., VOITS, M., FINK, H. Pharmacological evaluation of modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol.59, n.3, p.677-683, 1998.

RODGERS, R.J., DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus- maze test. *Eur. J. Pharmacol.*, vol.21, n.6, p.801-810, 1997.

RODGERS, R.J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T.J., BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology & Behavior*, n.68, p.47-53, 1999.

SANCHES, C. 5HT1a receptors play an important role in modulation of behaviour of rats in a two-compartment black and white box. *Behav. Pharmacol.* N.7, p.788-797, 1996.

SCHREIBER, R., DE VRY, J. Neuronal circuits involved in the anxiolytic effects of the 5-HT1a receptor agonists 8OH-DPAT, ipsapirone and buspirone in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, n.249, p.341-351, 1993.

STEFANSKI, R., PALEJKO, W., BIALZINSKI, A., KOSTOWSKI, W., PLAZNIK, A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and anxiolytic-like action of midazolam and 5HT1a receptors agonists. *Neuropharmacology*, n.32, p.977-985, 1993.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci. Biobehav. Ver.*, n.9, p.203-222, 1985.

VALENTINUZZI, V.S., FERRARI, E.A.M. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba livia*). *Physiology & Behavior*, vol.62, n.6., p.1203-1209, 1997.

WALL, P.M., MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, n.25, p.275-286, 2001.

WALSH, R.N., CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. *Psychol Bull*; n.83, p.482- 504, 1976.

WUTTKE, J.M., KELLEHER, R.T. Effects of some benzodiazepines on punished and unpunished behavior in the pigeon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, n.172, p.397-405, 1970.