



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE**  
**CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO DIAZEPAM EM**  
**MICOS-ESTRELA SUBMETIDOS A DOIS TESTES DE**  
**MEDO/ANSIEDADE: AMEAÇA HUMANA VERSUS**  
**CONFRONTO COM PREDADOR**

Priscila Lelis Cagni

Brasília, 2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO DIAZEPAM EM  
MICOS-ESTRELA SUBMETIDOS A DOIS TESTES DE  
MEDO/ANSIEDADE: AMEAÇA HUMANA VERSUS  
CONFRONTO COM PREDADOR**

Orientadora: Profa. Dra. Marília Barros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Priscila Lelis Cagni

Brasília, 2008



*'Ser neurocientista é ser uma espécie de astrônomo.  
Enquanto astrônomos observam o céu em busca de  
estrelas e galáxias, esperando um dia entender de onde  
vem a vastidão que nos cerca, neurocientistas devotam  
suas vidas investigando a atividade de enormes redes de  
células cerebrais que conjuntamente definem um  
microcosmo tão complexo e esplendoroso quanto o  
Universo que cobre as nossas cabeças.'*

**Miguel Nicolelis**

Dedico este trabalho à única figura de avô que eu tive nesse plano astral. Sem dúvida, uma das pessoas mais cultas que eu conheci.

Zbigniew Czajka  
✧ 05-11-1927  
† 29-01-2008

Você, que tanto quis ver esse trabalho pronto, agora me dá forças daí de cima para a conclusão dessa etapa. Obrigada por todo ensinamento que uma simples conversa com você oferecia.

*'It is hard enough to remember my  
opinions, without also remembering  
my reasons for them!'*

Friedrich Nietzsche

## **A G R A D E C I M E N T O S**

- À minha querida professora Dra. Marília Barros, meu obrigada de coração. Por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela paciência, por todo apoio e todos os seus ensinamentos ao longo dessa trajetória, que contribuíram para a minha formação. Pelo incentivo constante à realização do meu trabalho, e pela amizade cultivada ao longo desses dois anos.
- Aos professores Dr. Carlos Tomaz e Ph.D. Vitor Motta pelas sugestões e correções para o trabalho.
- Aos meus queridos colegas, futuros farmacêuticos; Israel, Nally e Felipe. Sem vocês, não seria possível a realização desse trabalho. Obrigada pela dedicação naquelas manhãs na fazenda, mesmo nos finais de semana ou feriados. Esse trabalho também é de vocês!
- Aos meus sujeitos experimentais: Bela, Bia, Cibele, Davi, Dinho, Fantasma, Golias, Mara, Michele, Miguel, Miriam, Mixo, Nana, Nhonho, Rui, Sula, Valdemiro, Valquíria, Vanessa e Vanússia; obrigada por colaborar com meu trabalho, mesmo que não tenham ‘ajudado’ sempre.
- Aos veterinários Dr. Danilo Teixeira e Dr. Raimundo de Oliveira pelo cuidado e carinho constantes com os animais e pelo apoio prestado durante a realização dos experimentos.
- Aos funcionários da Fazenda Água Limpa; Adão Pedro e Geinaldo, por me receberem tão bem no local de trabalho, e sempre se mostrarem dispostos a ajudar.

- Aos meus amados pais, por muito tentarem compreender e apoiar minhas escolhas. E pela ajuda financeira, sem a qual teria sido mais difícil a concretização desse sonho. Espero que a alegria que sinto agora os alegre também.

- À minha linda e amada irmã, Patrícia Cagni, pela ajuda braçal, pelo apoio moral, pelas risadas gostosas e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Eu amo você!

- Aos meus grandes e velhos amigos que sempre me incentivaram (mas que nem sempre entendiam quando eu tinha que 'sacrificar' algum dia do final de semana hehehe). Às minhas eternas amigas, obrigada por fazerem parte da minha vida. Tenho sorte de poder contar com tamanha cumplicidade, entendimento, carinho, além de toda a diversão que me proporcionam.

- Ao meu tio (e médico) Dr. Nênio Neniomar de Carvalho, por me atender sempre com carinho e fazer o possível para me disponibilizar o Diazepam para os experimentos. Ficou pronto tio... Obrigada!

- À CAPES pelo apoio financeiro conferido através da bolsa de mestrado.

- À Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde e ao Centro de Primatologia da UnB (CPUUnB), por possibilitarem a realização deste trabalho.

- Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

# SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> -----	i
<b>Sumário</b> -----	iii
<b>Lista de Abreviaturas</b> -----	v
<b>Resumo</b> -----	vi
<b>Abstract</b> -----	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	1
1.1. Ansiedade-----	1
1.1.1. Bases neuroanatômicas-----	4
1.1.2. Bases neuroquímicas-----	9
1.1.3. Aspectos farmacológicos dos benzodiazepínicos-----	12
1.2. Modelos experimentais para o estudo da ansiedade-----	16
1.2.1. Uso de primatas não-humanos em testes de ansiedade-----	19
1.2.2. Testes de medo/ansiedade em primatas-----	21
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> -----	26
<b>3. OBJETIVOS</b> -----	28
3.1. Objetivo geral-----	28
3.2. Objetivos específicos-----	28
<b>4. METODOLOGIA</b> -----	29
4.1. Experimento 1-----	29
4.1.1. Sujeitos-----	29
4.1.2. Droga-----	31
4.1.3. Procedimento experimental-----	31
4.1.4. Análise comportamental-----	35
4.2. Experimento 2-----	35
4.2.1. Sujeitos-----	36
4.2.2. Droga-----	36
4.2.3. Procedimento experimental-----	37
4.2.4. Análise comportamental-----	39
4.3. Análise estatística-----	40
<b>5. RESULTADOS</b> -----	41
5.1. Experimento 1-----	41

5.1.1. Fase 1 – HABITUAÇÃO	41
5.1.2. Fase 2 – CONFRONTO	43
5.2. Experimento 2	45
5.2.1. Teste de Ameaça Humana	46
5.2.2. Teste de Confronto com Predador	49
5.2.3. Teste de Ameaça Humana <i>versus</i> Confronto com Predador	52
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
6.1. Efeitos comportamentais e do diazepam	57
6.1.1. Experimento 1	57
6.1.2. Experimento 2	58
6.2. Aspectos metodológicos	63
6.3. Validade dos testes	66
6.4. Perspectivas futuras	68
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>69</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>82</b>
9.1. Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética no Uso Animal – IB/UnB	83
9.2. Anexo 2: Discriminação dos sujeitos utilizados nos experimentos 1 e 2	84
9.3. Anexo 3: Tabelas dos resultados obtidos para o monitoramento	85

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AH</b> .....	Teste de ameaça humana
<b>BZD</b> .....	Benzodiazepínico
<b>BZDs</b> .....	Benzodiazepínicos
<b>CP</b> .....	Teste de confronto com predador
<b>DAG</b> .....	Distúrbio da ansiedade generalizada
<b>DZP</b> .....	Diazepam
<b>EXP</b> .....	Intervalo exposição da sessão experimental
<b>GABA</b> .....	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA<sub>A</sub></b> .....	Receptor ácido $\gamma$ -aminobutírico tipo A
<b>GABA<sub>B</sub></b> .....	Receptor ácido $\gamma$ -aminobutírico tipo B
<b>GABA<sub>C</sub></b> .....	Receptor ácido $\gamma$ -aminobutírico tipo C
<b>IMAOs</b> .....	Inibidores da enzima monoaminoxidase
<b>MCP</b> .....	Matéria cinzenta periaquedutal
<b>PRE</b> .....	Intervalo pré-exposição da sessão experimental
<b>POS</b> .....	Intervalo pós-exposição da sessão experimental
<b>SCD</b> .....	Sistema cerebral de defesa
<b>S-H</b> .....	Septo-hipocampo
<b>SIC</b> .....	Sistema de inibição comportamental
<b>SNC</b> .....	Sistema nervoso central
<b>ISRSs</b> .....	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

## RESUMO

Apesar dos distúrbios de ansiedade apresentarem uma alta prevalência na nossa sociedade, as opções de tratamento farmacológico ainda são restritas e apresentam uma série de efeitos adversos indesejados. Nesse sentido, modelos 'etológicos' se aproximam mais do que realmente ocorre na natureza e podem ter seus resultados melhor extrapolados para humanos, apesar de testes desta natureza serem escassos em primatas não-humanos. Calitriquídeos, em particular, sofrem altas taxas de predação, mantendo suas estratégias de defesa mesmo em cativeiro. Seu amplo espectro de indicadores comportamentais representa uma oportunidade ímpar para se avaliar o comportamento emocional, podendo ser utilizados como ferramenta para estudo do medo/ansiedade. O presente estudo, portanto, teve como objetivo avaliar as respostas comportamentais de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) submetidos aos testes de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), sob efeito do ansiolítico benzodiazepínico diazepam (DZP). Cada sujeito (n=13) foi submetido pseudo-randomicamente a quatro sessões de habituação. Em seguida, para cada um dos dois testes, os sujeitos foram submetidos a outras quatro sessões de confronto (0; 1; 2 e 3 mg/kg de DZP). Cada sessão consistiu de 15-min de observação: 5-min antes, 5-min durante a exposição a um experimentador humano ou a um gato taxidermizado (gato-do-mato) e 5-min após a exposição. A administração de todas as doses de DZP induziu uma diminuição significativa na atividade locomotora, antes, durante e depois do confronto, sugerindo um possível efeito sedativo deste fármaco. Foi então realizado um novo experimento onde os sujeitos (n=10) foram submetidos novamente a quatro sessões de confronto por estímulo, porém, com doses mais baixas de DZP (0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg). Uma rápida exposição (5 min) ao experimentador induziu um aumento

significativo nas taxas de olhares diretos e vocalização de alarme, além de uma redução nos níveis de proximidade e comportamentos deslocados. A administração de DZP reverteu, significativamente, apenas a frequência de olhares diretos. O confronto com o gato taxidermizado alterou, de forma significativa, a taxa de olhares diretos, a qual não foi re-estabelecida pelo DZP. Além disso, não foram observadas diferenças significativas em cada uma das respostas, quando na presença destes dois estímulos, sugerindo que estes exercem um efeito similar. Contudo, no conjunto das alterações observadas, o experimentador humano pareceu ser mais eficaz, podendo isso ser devido em parte aos procedimentos rotineiros de captura/manipulação. Já para o gato taxidermizado, vários fatores podem ter contribuído para a baixa responsividade, como a exposição repetida, o confronto realizado em um ambiente altamente familiar, a presença de um outro animal no viveiro, o uso de sujeitos com exposição prévia ao estímulo e o uso de um objeto que não é uma ameaça real. Diferenças na duração da exposição e nos ambientes físico e social, também podem ter influenciado as discrepâncias vistas entre os resultados deste estudo dos descritos na literatura. Dessa forma, os testes de AH e CP podem vir a ser boas ferramentas experimentais para a avaliação do medo/ansiedade e o desenvolvimento de novas compostos com potencial valor terapêutico. Porém, novos estudos, avaliando os fatores discutidos, são necessários para uma melhor elucidação dos aspectos de medo/ansiedade sendo avaliados nestes testes.

## **ABSTRACT**

Although anxiety disorders have a high prevalence in our society, few pharmacological options exist for its treatment, having well-established unwanted effects. In this sense, ethologically based animal models approximate the natural conditions under which such emotional states are elicited and thus provide comparable results to anxiety seen in humans. Such models using non-human primates, however, are scarce. Callitrichids, in particular, suffer one of the highest rates of predation among primates. Their anti-predation strategies are even observed among captive individuals. Thus, defense-related behaviors in this primate may represent a unique opportunity to evaluate fear and anxiety in an experimental setting. Therefore, this study aimed at investigating the defense-related response of captive marmosets (*Callithrix penicillata*) submitted to two experimental tests of fear/anxiety: Human Threat (HT) and Predator Confrontation (PC). The effects of the anxiolytic diazepam (DZP) were also evaluated. Each subject (n=13) was pseudo-randomly submitted to four habituation trials, followed by four confrontation sessions (0; 1; 2 e 3 mg/kg of DZP) for each test. Each session consisted of a 15-min observation period: 5-min prior, 5-min during a confrontation with a human observer or a natural taxidermized predator (oncilla cat) and 5-min following the exposure. The DZP administrations induced a significant decrease of the marmoset's locomotion, before, during and after the confrontation, indicating a possible sedative effect. Thus, a second experiment was held, during which subjects (n=10) were once again submitted to another four confrontations trials. However, lower doses of DZP were used (0; 0,10; 0,25 e 0, 50 mg/kg). A rapid exposure (5-min) to the human observer induced a significant increase in direct gazes and alarm calls, as well as a decrease in proximity and displacement activities. DZP administration only significantly reversed the frequency of direct gazes.

Confrontation with the taxidermized cat significantly altered solely the levels of direct gazes, although DZP injections did not reverse this response. Furthermore, significant differences between each behavioral parameter were not observed, when in the presence of the stimuli, suggesting that they exert a similar effect. However, when analyzing the whole behavioral profile observed, the human observer seemed to be more effective. This may have been due to the routine capture/manipulation procedures. For the taxidermized cat, several factors could have contributed to the low responsiveness, such as the repeated exposure procedure, the confrontations taking place in a highly familiar environment, the presence of other subject in the home-cage, the use of experienced subjects and the fact that the stimulus was not truly a threat. Differences in terms of the duration of the confrontations and the physical and social environment may also have influenced the discrepancies seen between the results from the present study and those of previous investigations. Therefore, the AH and PC tests may possibly be used as an experimental tools to evaluate fear/anxiety and screen new compounds with potential therapeutic value. However, new studies are necessary to fully assess the factors discussed, in order to better elucidate the aspects of fear/anxiety which are being analyzed in these tests.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ANSIEDADE

A palavra ansiedade advém do grego *anshein*, que significa estrangular, sufocar ou oprimir (Cunha, 1999). Em latim, os termos correlatos *anxietas* e *anxietatis* indicam aflição, angústia, desejo veemente e desconforto (Machado, 1995) denotando, portanto, a algo ruim, dispensável para o homem. Porém, ao longo da história tem-se visto a ansiedade como uma resposta emocional normal, ocorrendo, principalmente, diante da expectativa ou antecipação de estímulos ou situações presentes no ambiente (ex. Rodgers e cols., 1997). Neste contexto, a ansiedade constitui uma emoção normal, advertindo sobre perigos de dano físico, dor, impotência, possíveis punições, separação social, entre outros. (Sandford e cols., 2000). Desta forma, ela estimula o organismo a tomar as medidas necessárias para impedir a ameaça ou, no mínimo, reduzir suas conseqüências (Brandão, 2001). Ademais, a ansiedade parece estar intimamente associada ao medo, uma resposta emocional básica frente a um estímulo ameaçador no ambiente, estando o seu circuito neural envolvido em alguns tipos de ansiedade (LeDoux, 1996; 1998).

Desta forma, o medo e a ansiedade fazem parte das primeiras linhas de defesa na natureza – particularmente em mamíferos – compreendendo a habilidade de prever o perigo antes que ele ocorra de fato (Kim e Gormam, 2005). Portanto, neste contexto, e considerando que foram moldados ao longo da evolução pelo processo de seleção natural, o medo e a ansiedade têm um importante significado adaptativo e evolutivo, sendo emoções fundamentais para a sobrevivência (Darwin, 1872; McNaughton, 1997; Nesse, 1999).

A ansiedade pode ser observada em duas importantes formas, a saber: ansiedade traço e ansiedade estado. A primeira corresponde a uma resposta persistente e duradoura, inerente à personalidade do indivíduo, indicando a forma com que ele interage

com seu ambiente físico e social. A ansiedade estado, por sua vez, é a resposta de um determinado indivíduo a uma situação específica. Essa resposta pode mudar, ao longo do tempo, em decorrência do nível de estresse e de acordo com o modo com que este é percebido pelo indivíduo (revisado em Sandford e cols., 2000).

Apesar de ser uma resposta emocional normal, a ansiedade pode se adquirir características patológicas no homem, ocorrendo em momentos inapropriados ou de forma exacerbada (Sandford e cols., 2000). Neste estado a resposta emocional torna-se inadequada a um determinado estímulo, em virtude de sua intensidade e/ou duração. Pode provocar confusão e distorções da percepção temporal e espacial em relação a pessoas e ao significado dos acontecimentos. Estas distorções podem interferir no aprendizado pela diminuição da concentração, redução da memória e prejuízo da capacidade de associação (Brandão, 2001).

A ansiedade varia em tanto termos quantitativos (i.e., duração e intensidade), como qualitativos. Uma simples preocupação diária persistente é diferente de uma expectativa a um desafio, que por sua vez também é diferente de uma crise súbita, rápida, imprevisível e irracional de medo intenso. Essas respostas podem ser normais em condições apropriadas, porém, patológicas e mal adaptadas quando em situações inapropriadas. Essas diferenças fenomenológicas também podem ser acompanhadas por diferenças em termos das respostas fisiológicas, autonômicas e farmacológicas, o que levou à necessidade de se descrever e entender melhor as diversas reações comportamentais e fisiológicas associadas à ansiedade (Sandford e cols., 2000).

Os distúrbios associados à ansiedade podem ser classificados com base nos seus fenômenos (intensidade, duração, qualidade, curso natural do distúrbio, sintomas e histórico familiar), respondendo de maneira diferenciada aos tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente. A ansiedade patológica necessita de intervenção terapêutica e pode ocorrer em decorrência de outras patologias, psicológicas e/ou fisiológicas, sendo considerada, nesses casos, uma manifestação secundária. Quando é a principal ou única

manifestação observada, a ansiedade se enquadra nos distúrbios ou transtornos de ansiedade primária (Graeff, 1996). Independente de ser uma manifestação primária ou ocorrer em comorbidade com outras patologias, um quadro clínico de ansiedade patológica tem se tornado cada vez mais freqüente em nossa sociedade, acometendo aproximadamente 25% da população (Kim e Gorman, 2005).

Pela classificação do DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, elaborado pela Associação Psiquiátrica Americana – APA), em vigor desde 1994, os vários tipos de ansiedade patológica passam a ser classificados como ansiedade generalizada, pânico – com ou sem agorafobia, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do estresse pós-traumático, distúrbio de ansiedade atípica e as fobias (agorafobia, social e simples). Mais especificamente, o distúrbio do pânico é caracterizado pela recorrência de ataques de pânico, um episódio súbito e inesperado de medo intenso, acompanhado por manifestações somáticas ou cognitivas, incluindo palpitações, falta de ar, tremores, tonturas, náuseas, e medo de perder o controle, enlouquecer ou morrer. Os distúrbios de pânico vêm sendo tratados farmacologicamente com antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) e inibidores da enzima monoaminoxidase (IMAOs). Por outro lado, o distúrbio da ansiedade generalizada (DAG) é uma perturbação crônica caracterizada por uma tensão ou apreensão excessiva, sem causa aparente, com relação a diversos aspectos da vida cotidiana, acompanhado dos seguintes sintomas: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono. O DAG vem sendo tratado farmacologicamente com ansiolíticos benzodiazepínicos (BZDs) e, em menor escala com antidepressivos tricíclicos, ISRSs e IMAOs (Graeff, 1999).

Além disso, sabe-se que os diversos tipos de ansiedade afetam diferentemente as estruturas cerebrais (Sandford e cols., 2000). Neste sentido, os sistemas neurais envolvidos na ansiedade normal e patológica vêm sendo intensamente investigados, podendo sua elucidação contribuir significativamente para uma melhor compreensão de

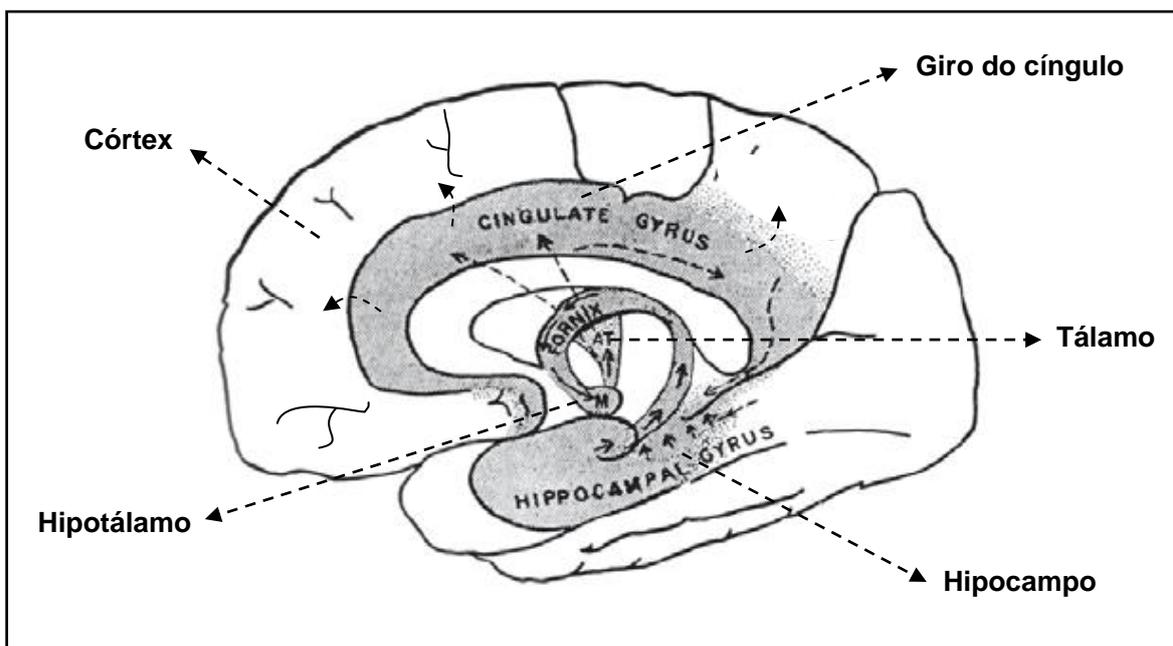
funções específicas dentro do complexo circuito neural responsáveis pelas emoções de medo e ansiedade (Sandford e cols., 2000; Kim e Gorman, 2005), assim como para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos para os distúrbios a eles associados.

### **1.1.1. Bases neuroanatômicas**

A elucidação dos circuitos neurais que subsidiam a ansiedade tem sido baseada em experimentos com animais e em estudos clínicos com humanos (neuroimagem estática ou funcional). Por ser essencialmente uma resposta emocional, é de se esperar que as estruturas implicadas na ansiedade façam parte do sistema límbico (Graeff, 1999). Este compreende a parte mais velha, filogeneticamente, do córtex cerebral e é considerado o centro das emoções (Kim e Gorman, 2005). Em 1878, Paul Broca, um neurocirurgião francês, cunhou a expressão 'sistema límbico' para se referir ao anel cortical que envolve o tronco encefálico (Graeff e Hetem, 2004). Com base em evidências experimentais e clínicas, o neuroanatomista James Papez aplicou conotação funcional a este conceito de sistema límbico, identificando neste um papel principal no controle das emoções. Foi o Circuito de Papez, um dos primeiros a implicar também o hipocampo na regulação das emoções (Graeff, 1999; Dalgleish, 2004; Machado, 2006).

Este circuito, compreendendo estruturas do lobo límbico até então identificadas (giro para-hipocampal, giro do cíngulo, giro subcaloso e o córtex subjacente à formação hipocampal), formava o principal substrato neural das emoções. Papez, ao elaborar um circuito que explicava a comunicação dos centros corticais superiores com o hipotálamo, propôs um papel de processador de informações neurais de caráter emocional ao hipocampo (ex. Graeff, 1999). Sabe-se hoje que essa estrutura transmite informações aos corpos mamilares do hipotálamo, através do fórnix. Seguindo este circuito, via os corpos mamilares do hipotálamo, as informações de cunho emocional são então

projetadas para o tálamo, passando pelo trato mamiló-talâmico, para depois seguirem até o giro do cíngulo. Por fim, a atividade neural é repassada para outras regiões corticais a partir do córtex cíngulo, recebendo, assim, novos aspectos emotivos (ex. Graeff, 1999; Figura 1).

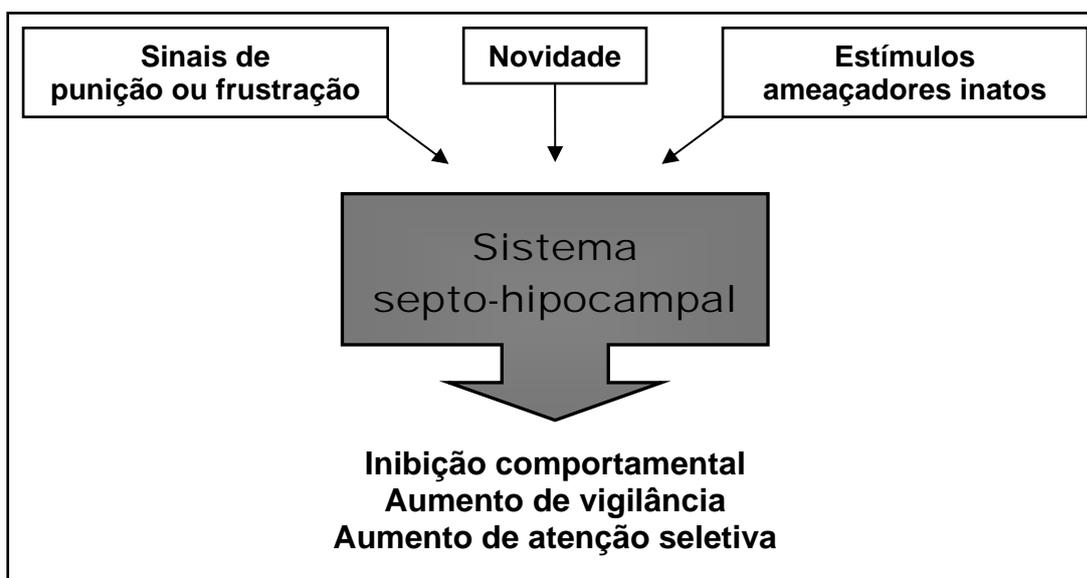


**Figura 1.** Esquema ilustrativo do circuito de papez. Adaptado de Ribas, 2007.

Contudo, novos estudos indicaram a participação de outras estruturas na regulação das emoções. A exemplo disso, Paul MacLean, em 1949, acrescentou outras estruturas ao circuito de Papez, como o hipotálamo - que regula a expressão neurovegetativa e hormonal dos estados emocionais - e a amígdala - que exerce papel fundamental sobre o medo e a ansiedade (MacLean, 1952).

Um dos sistemas formulados para o estudo das emoções que também atribui valor essencial ao hipocampo é o Sistema de Inibição Comportamental (SIC; Figura 2). Elaborado na década de 60, pelo psicólogo Jeffrey Gray, este constructo teórico, em sua primeira versão, correlacionava a ansiedade à ativação do SIC, a partir de determinadas classes de estímulos: sinais condicionados de punição, de frustração, de perigos inatos e estímulos ou situações novas (Graeff e Hetem, 2004). Posteriormente, Gray concluiu que

as alterações comportamentais mais próximas das resultantes de agentes ansiolíticos eram as lesões do septo, do hipocampo ou de ambas as estruturas (Graeff e Hetem, 2004). Portanto, o hipocampo e o septo fazem parte do SIC. Pelo fato dessas estruturas apresentarem íntimas conexões neurais, o termo sistema septo-hipocampal (S-H) também passou a ser utilizado em referência ao SIC. Assim, estímulos inatos e condicionados de medo, novidade e sinais de frustração ativariam o SIC. Esse, por sua vez, ao ser ativado, promoveria a inibição de comportamentos, ou seja, produziria a “ansiedade”. Nesses casos, o sujeito passaria a um estado de níveis de alerta e atenção mais altos (Gray, 1982).



**Figura 2.** Representação esquemática do Sistema de Inibição Comportamental (SIC). Adaptado do livro *Fundamentos de Psicofarmacologia* (Graeff e Guimarães, 1999).

A ansiedade é mais que uma simples e estereotipada resposta a um estímulo aversivo. Animais e humanos, em especial, aprendem complexas associações de estímulos adversos, e são capazes de executar respostas discriminativas. Para isso é necessário um “sistema comparador” capaz de detectar quando a ameaça é familiar ou uma novidade. Nesse sentido, tem sido atribuído ao hipocampo esse papel (Sandford e cols., 2000), disfunções em sua atividade normal resultam em dificuldade de aprendizado, levando a uma generalização do medo (LeDoux, 1998). Além disso, sabe-se que, em

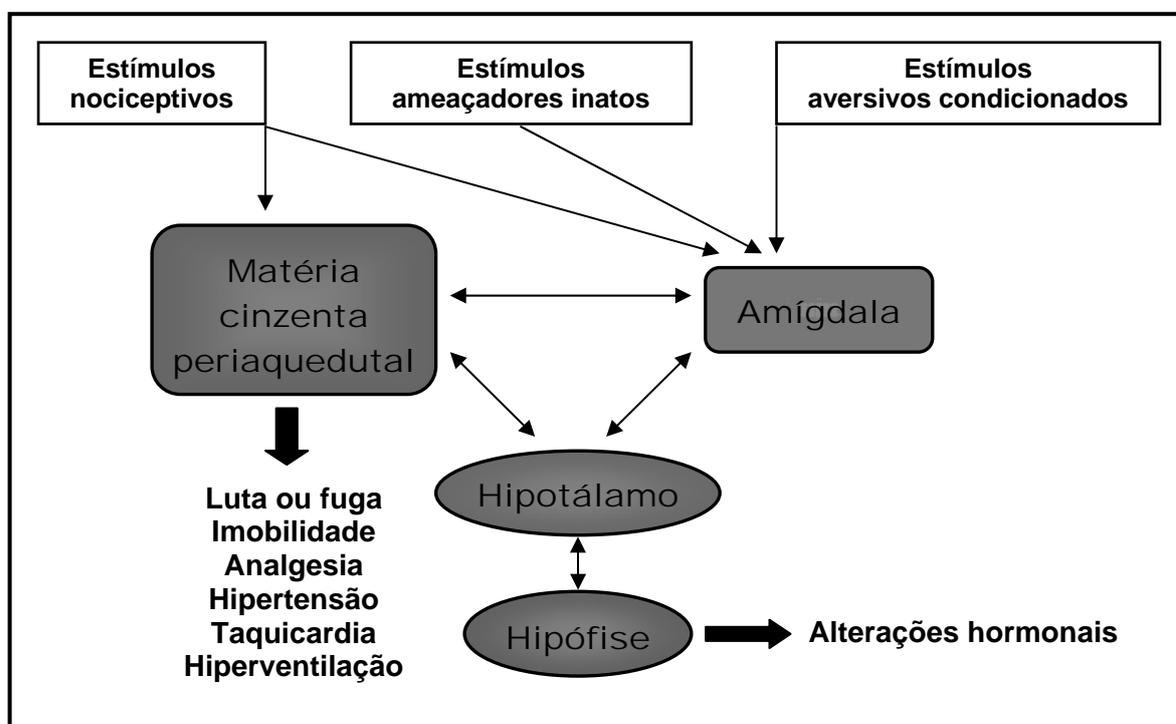
animais, o estresse crônico causa sério prejuízo na atividade hipocampal (Sapolsky, 1996).

A amígdala é uma massa esferóide de substância cinzenta formada por um denso conjunto de núcleos e subnúcleos, suas conexões são extremamente amplas e complexas (Machado, 2006). Tanto a amígdala quanto o sistema S-H recebem projeções do córtex associativo polimodal, informações de todos os sentidos chegam até estas estruturas (LeDoux, 1996). A amígdala não apenas detecta e organiza as respostas a ameaças “naturais” como também, pode ser o centro do aprendizado de novas ameaças, conhecido como condicionamento clássico (LeDoux, 1996). Portanto a amígdala faria uma interface entre aspectos emocionais e cognitivos (Tomaz e cols., 1993). Havendo discrepância entre essas informações, seria gerada uma inibição comportamental (Gray, 1982). A ativação desse sistema, denominado sistema de inibição comportamental (SIC), resulta em um estado de ansiedade modulada, principalmente, pela neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica, provenientes da região mesencefálica (Gray, 1982). Drogas ansiolíticas, como os BZDs, podem atuar reduzindo a ativação dessas vias monoaminérgicas (ex. Graeff, 1999) e, dessa forma, a amígdala constitui um importante alvo para manipulações farmacológicas (Sandford e cols., 2000). A amígdala também possui conexões com outras áreas cerebrais, projetando-se para o hipotálamo e regiões do tronco encefálico, resultando em respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais que compõem as complexas reações de medo/ansiedade (LeDoux, 1998).

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP), por sua vez, recebe projeções da amígdala e das vias sensoriais interoceptivas e nociceptivas. Sendo assim, acredita ser a estrutura responsável pelas respostas mais simples, incondicionadas e automáticas a ameaças de natureza inata (Sandford e cols., 2000). Além disso, a MCP atua no sentido

de selecionar e comandar a resposta de defesa e aspectos neurovegetativos a esses estímulos (Fanselow, 1991).

Outro conceito em relação à ativação do circuito cerebral frente a respostas emocionais iniciou-se com Charles Darwin. O denominado Sistema Cerebral de Defesa (SCD) refere-se, essencialmente, a repertórios emocionais em animais, decorrente de pressões evolutivas. Ao estudar as reações de defesa em gatos com eletrodos implantados no hipotálamo medial, o pesquisador suíço Robert Hess denominou “reação de defesa afetiva” ao comportamento apresentado pelos animais que se assemelhava, quando estimulado, ao comportamento de animais diante de seus predadores (Graeff e Hetem, 2004). Mais tarde, novos estudos verificaram que a estimulação da amígdala também produzia uma “reação de defesa afetiva”. Portanto, este conjunto de estruturas neurais ativadas em estados de medo e ansiedade ficou conhecido efetivamente como SCD (Figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática do Sistema Cerebral de Defesa. Adaptado do livro *Fundamentos de Psicofarmacologia* (Graeff e Guimarães, 1999).

O hipotálamo é uma massa muito pequena de substância cinzenta agrupada em núcleos, localizado no diencéfalo e pesa apenas 4g em um cérebro de 1.200g. Possui conexões amplas e complexas (Machado, 2006). O hipotálamo recebe projeções do sistema límbico (amígdala, hipocampo, septo e área cortical pré-frontal) e da MCP, além disso, estabelece conexões viscerais e com a hipófise (Sandford e cols., 2000; Machado, 2006). Por isso, o hipotálamo tem papel importante na coordenação das respostas neuroendócrinas à ansiedade atuando através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise, e resultando na liberação de hormônios (Graeff, 1996; Sandford e cols., 2000; Kim e Gorman, 2005; Machado, 2006).

Portanto, no que diz respeito à ansiedade e às emoções relacionadas, tal como o medo, pode-se dizer que as raízes biológicas estão arraigadas nas reações de defesa dos mamíferos. Seguindo esse pensamento, é possível acreditar que o sistema cerebral de defesa e o sistema de inibição comportamental atuam de modo complementar (Brandão, 2001).

Diferentes estruturas cerebrais com complexas conexões participam das reações de medo/ansiedade. Essas regiões são heterogêneas e se comunicam através de diferentes vias de neurotransmissores. Portanto, o estudo dessas vias neurotransmissoras fornece uma peça importante para o entendimento da ansiedade (Millan, 2003; Kim e Gorman, 2005).

### **1.1.2. Bases neuroquímicas – via GABAérgica**

Diversas vias neurotransmissoras têm sido implicadas nas respostas de medo/ansiedade, porém, o maior número de trabalhos está focado na serotonina (5-HT) e na neurotransmissão GABAérgica. Esta ênfase em determinadas vias está, possivelmente, associada à comprovada eficácia clínica de compostos que afetam esses neurotransmissores na modulação das respostas de medo e ansiedade (Sandford e cols.,

2000). Como o presente estudo se propôs a investigar os efeitos do ansiolítico benzodiazepínico diazepam, que modula a neurotransmissão GABAérgica, apenas essa via será discutida a seguir.

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é um aminoácido derivado da glutamina. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo aproximadamente 40% de todas as sinapses GABAérgicas (Graeff, 1999). Os neurônios GABAérgicos enervam estruturas cerebrais distantes de seus corpos celulares e dendritos (na via nigroestriatal e no córtex cerebelar), mas em sua maioria, estão envolvidos na modulação local, prevenindo uma atividade neural excitatória excessiva. Inclusive, estruturas corticais do sistema límbico, conhecidamente envolvidas na modulação da ansiedade, como o hipocampo, septo, amígdala e MCP, contém inúmeras redes de inter-neurônios GABAérgicos e projeções GABAérgicas (Bateson, 2002; Millan, 2003).

Os receptores para GABA se dividem em duas grandes classes: os ionotrópicos ( $GABA_A$  e  $GABA_C$ ) e os metabotrópicos ( $GABA_B$ ). A diferença entre esses receptores tem como base a localização, a utilização e/ou tipo de segundo mensageiro e aspectos farmacológicos (Cooper e cols., 1996; vide Tabela 1). Os receptores do tipo  $GABA_A$  e  $GABA_C$  são canais iônicos transmembrânicos, porém, diferem farmacologicamente. Ambos são formados por cinco subunidades transmembrana e, quando ativado pela ligação extracelular de GABA, aumentam a permeabilidade da membrana aos íons cloreto (Chebib, 2004; Wafford, 2005).

Nos receptores do tipo  $GABA_A$ , as subunidades são formadas por proteínas com estruturas distintas, pertencentes a diferentes famílias. A maioria dos receptores  $GABA_A$  é formada por subunidades das famílias  $\alpha$ -(1-6),  $\beta$ -(1-3) e  $\gamma$ -(1-3) (Rowlett e cols., 2005). Quando este receptor está localizado na membrana pós-sináptica, o influxo de cloreto induz uma hiperpolarização do neurônio em questão, dificultando a despolarização

excitatória, resultando na inibição da transmissão, conhecida como inibição pós-sináptica. Já os receptores GABA<sub>A</sub> localizados na membrana pré-sináptica, promovem o efluxo de cloreto, despolarizando a célula, resultando em uma menor liberação do neurotransmissor excitatório na fenda sináptica – uma inibição pré-sináptica (Cooper e cols., 1996; Graeff, 1999).

**Tabela 1.** Tipos e caracterização farmacológica dos receptores GABAérgicos.

Tipo de receptor	Canal iônico	Segundo Mensageiro	Atividade Farmacológica		
			Agonistas	Antagonistas	Moduladores
GABA <sub>A</sub>	Cl <sup>-</sup>	na	GABA muscimol	bicuculina picrotoxina	BZDs barbitúricos esteróides
GABA <sub>B</sub>	↑ K <sup>+</sup> ↑ Ca <sup>2+</sup>	adelinatociclase fosfatidil inositol	GABA baclofen	faclofen	CGP7930 GS39783
GABA <sub>C</sub>	Cl <sup>-</sup>	na	GABA CACA	TPMPA	??

na = não se aplica; GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico; BZDs = benzodiazepínicos; CGP7930 = N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine; GS39783 = N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine; CACA = cis-4-aminocrotonic acid; TPMPA = (1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl) methylphosphinic acid. Adaptado do livro *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* (Cooper e cols., 1996); Chebib, 2004 e Cryan e Kaupmann, 2005.

Receptores do tipo GABA<sub>A</sub> foram, por muito tempo, os mais estudados por serem o sítio de ação de drogas que agem como ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares. Estudos recentes revelaram a existência de vários subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> e pesquisas com roedores postularam que os diversos efeitos dos ansiolíticos benzodiazepínicos parecem estar ocorrendo em decorrência da ação nos diferentes subtipos (Rowlett e cols., 2005; vide seção 1.1.3 abaixo).

Os receptores GABA<sub>C</sub>, assim como os receptores GABA<sub>A</sub>, são canais iônicos, porém possuem diferentes propriedades farmacológicas. Esses receptores são encontrados em grande quantidade na retina, mas estudos recentes mostram sua

localização também em diversas partes do Sistema Nervoso Central (revisado em: Pan e cols., 2006). Ademais, no receptor GABA<sub>C</sub>, o ligante natural endógeno GABA parece ser mais potente do que no receptor GABA<sub>A</sub> (Gibbs e Johnston, 2005), sendo o primeiro também mais sensível a compostos agonistas ou antagonistas (Zhang e cols., 2001). Os receptores GABA<sub>C</sub> são formados por proteínas da família  $\rho$ -(1–5) e em sua maioria são formados pelas subfamílias  $\rho$ 1 e  $\rho$ 2 (Chebib, 2004; Pan e cols., 2006). Em termos funcionais, Johnston e cols. (1998) avaliaram uma possível participação dos receptores GABA<sub>C</sub> em processos cognitivos.

Por último, os receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> também podem ser encontrados pré- e pós-sinapticamente, sendo expressos em grande quantidade no sistema límbico (Cryan e Kaupmann, 2005) e formados por heterodímeros compostos por duas subunidades: GABA<sub>B1(a e b)</sub> e GABA<sub>B2</sub>. Os na membrana pré-sináptica são acoplados indiretamente a canais de cálcio. Dessa forma, a ativação deste receptor aumenta a permeabilidade ao cálcio, diminuindo uma posterior liberação de GABA na fenda sináptica (auto-receptores) ou de outros neurotransmissores (ex. neuropeptídeos) – os heteroreceptores. Os receptores GABA<sub>B</sub> pós-sinápticos são acoplados a canais de potássio que quando ativados, aumentam a liberação desses íons positivos pelo neurônio, causando um aumento lento no potencial inibitório do GABA (Cryan e Kaupmann, 2005).

A ativação da via inibitória GABAérgica é o mecanismo básico de ação dos ansiolíticos benzodiazepínicos no tratamento dos distúrbios de ansiedade generalizada, pânico, distúrbios do sono e na epilepsia (Rudolph e Möhler, 2006).

### **1.1.3. Aspectos farmacológicos dos benzodiazepínicos**

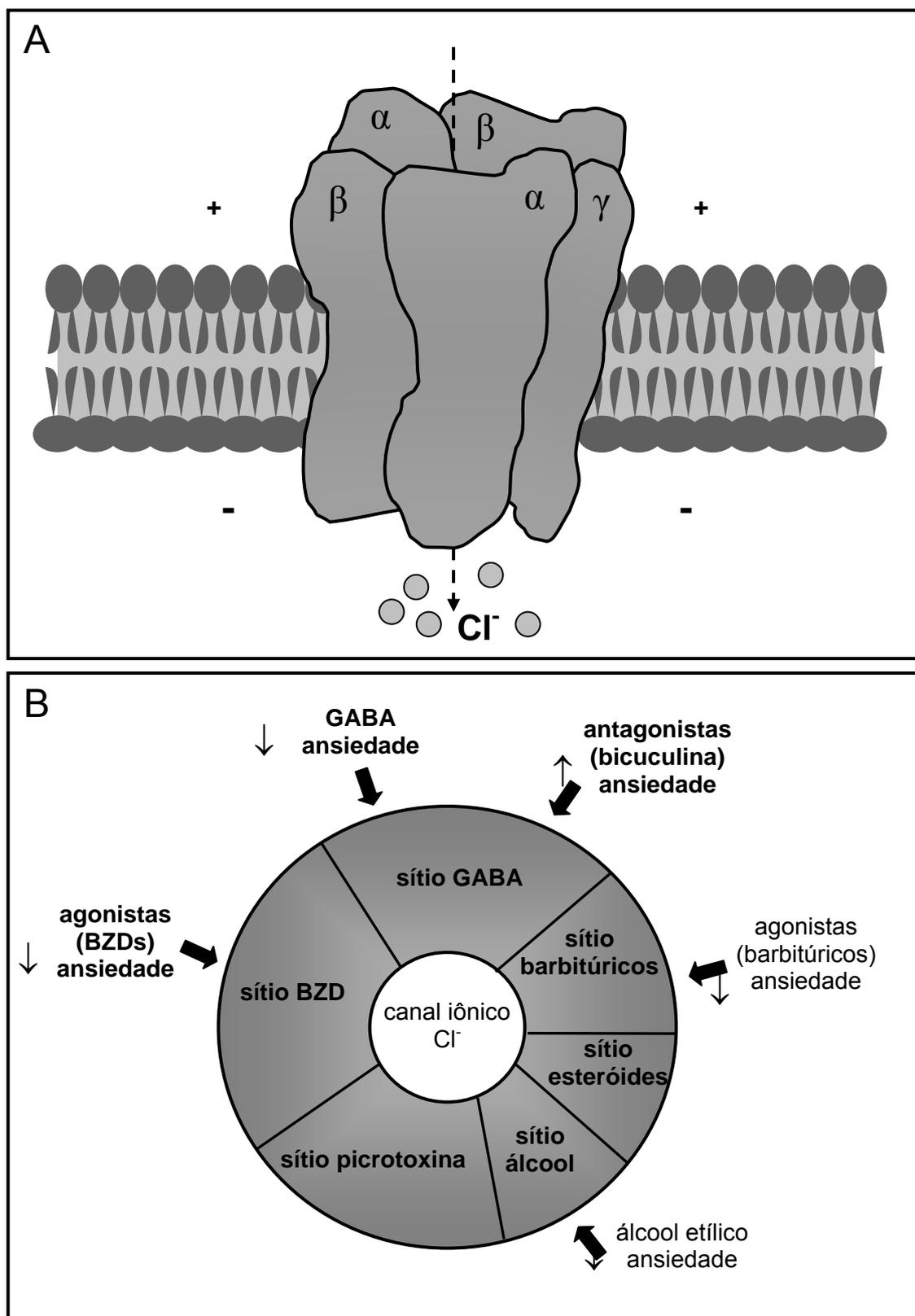
Os BZDs são os compostos ansiolíticos mais utilizados clinicamente, embora seu uso venha declinando nos últimos anos (Graeff, 1999). Apesar de terem sido introduzidos na prática clínica em 1960, foi apenas em 1967 que seu mecanismo de ação foi elucidado

através de trabalhos que demonstraram uma interação entre os BZDs e o neurotransmissor GABAérgico (ex. Bateson, 2002).

De fato, os BZDs apresentam um sítio de ligação específico no receptor GABAérgico, sendo esta ligação dependente da presença de subunidades  $\alpha$  no receptor GABA. Portanto, os BZDs se ligam exclusivamente aos receptores GABA<sub>A</sub> (Millan, 2003). Uma vez ligado a esta subunidade, os BZDs alteram a conformação do receptor GABA<sub>A</sub>, que por sua vez, facilita a ligação do GABA ao mesmo, e assim aumenta a permeabilidade do canal de cloreto e amplifica a resposta biológica (Graeff, 1999; Sandford e cols., 2000; Bateson, 2002). Visto que dependem da presença de GABA na fenda sináptica para exercer sua ação, os BZDs não possuem ação intrínseca própria, sendo considerados moduladores (e não mediadores) da atividade sináptica.

A descoberta do sítio modulador dos BZDs gerou uma busca por outros sítios no receptor GABA<sub>A</sub>, já tendo sido identificados regiões específicas para ligação de barbitúricos, esteróides, álcool e picrotoxina. Inclusive, essa variedade de sítios modulatórios contribuiu para elucidação da semelhança entre o perfil farmacológico de estruturas químicas distintas (ex. barbitúricos, álcool, DZP), que apresentam tolerância cruzada, e são capazes de interagirem entre si (Graeff, 1999; Sandford e cols., 2000; Figura 4).

Os BZDs exercem diversos efeitos comportamentais em humanos e testes experimentais com animais, podendo ser utilizados como anticonvulsivantes, sedativos/hipnóticos, relaxantes musculares e ansiolíticos. Uma vez que apresentam um perfil farmacodinâmico semelhante, em termos de afinidade e eficácia, diferenças farmacocinéticas entre os compostos determinam em grande parte sua aplicabilidade clínica (Bateson, 2002). Além disso, sabe-se que os BZDs podem amplificar os efeitos de depressores do SNC. Sendo assim, seu uso concomitante com, por exemplo, a ingestão de bebidas alcoólicas não é recomendado (Graeff, 1999).



**Figura 4.** Representação esquemática de um receptor GABA<sub>A</sub>. (A) representação tridimensional do receptor na membrana plasmática. (B) representação dos sítios de ligação do complexo receptor GABA/BZD.

Dentre os subtipos de receptores GABA<sub>A</sub>, os mais encontrados são aqueles formados por duas unidades  $\alpha$ , duas unidades  $\beta$  e uma unidade  $\gamma$ . Os resíduos de aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  contribuem para a ligação do GABA, enquanto que os resíduos dos aminoácidos das subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  para a ligação BZD. Estes se ligam predominantemente em sítios localizados entre as subfamílias  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ou  $\alpha 5$ , com a subfamília  $\gamma 2$ , ativando o complexo receptor, sendo inativos nos receptores que contém as subfamílias  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  (Rudolph e Möhler, 2004; Rowlett e cols., 2005).

Além disso, estudos farmacológicos com camundongos transgênicos (Rudolph e Möhler 2004; 2006) e em primatas (Rowlett e cols., 2005) têm apontado para funções distintas entre os diferentes subtipos do receptor GABA<sub>A</sub>. De acordo com Rowlett e cols. (2005), receptores formados pelas subunidades  $\alpha 2$ , 3 e 5 seriam responsáveis pelo efeito ansiolítico dos BZDs, enquanto que os efeitos motores e sedativos ocorreria pela ativação dos receptores formados pelas subunidades  $\alpha 1$ . A identificação desses efeitos em diferentes receptores é um importante passo para o desenvolvimento de drogas seletivas para o tratamento de transtornos de ansiedade (Rudolph e Möhler, 2004; 2006; Rowlett e cols., 2005).

A utilização de BZDs no tratamento da ansiedade gera efeitos indesejáveis como relaxamento muscular, ataxia, sonolência diurna e dependência física, além de possuírem propriedades sedativo-hipnóticas e efeito amnésico anterógrado (Graeff 1999; Bateson, 2002). A tolerância aos efeitos dos BZDs é diferenciada e a retirada súbita do medicamento em tratamento crônico pode causar síndrome de retirada (Bateson, 2002).

Se por um lado os BZDs se destacam pela série de efeitos farmacológicos (alguns indesejáveis), a ausência de alguns efeitos também é importante e justifica sua utilização como agentes ansiolíticos largamente empregados na clínica. Esses compostos são praticamente destituídos de efeitos periféricos nos sistemas cardiovascular, respiratório,

digestivo, urinário e ósseo, além de não afetar os sistemas nervoso simpático e parassimpático (Graeff, 1999).

Dentre os compostos BZDs desenvolvidos até o presente, destaca-se o DZP cuja ação ansiolítica já foi comprovada em diversos estudos com animais, sendo um dos compostos mais empregados para o tratamento dos distúrbios da ansiedade em humanos (Graeff, 1999; Bateson, 2002). O DZP é rapidamente absorvido por via oral, altamente lipossolúvel e atravessa tanto a barreira hemato-encefálica, quanto a barreira placentária durante a gravidez. Este ansiolítico sofre biotransformação hepática, sendo alguns desses metabólitos altamente ativos, podendo gerar um efeito cumulativo com o uso de doses repetidas (Katzung, 2003).

Por possuir ação ansiolítica bem estabelecida, o DZP é largamente empregado na validação farmacológica de novos testes experimentais de medo/ansiedade.

## **1.2. Modelos experimentais para o estudo da ansiedade**

A influência do processo de seleção natural, e suas implicações sobre a neurobiologia do medo/ansiedade, foram inerentemente incorporadas ao estudo destas respostas emocionais que ocorrem no homem, através do uso de testes experimentais em animais. Esta abordagem baseia-se essencialmente na análise comparativa do repertório comportamental de espécies aparentadas, com estruturas anatômicas e processos fisiológicos semelhantes (Hall, 1994; Gilbert, 1996). Baseado nesta perspectiva evolutiva do comportamento emocional, estudos relacionados aos componentes anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos do medo/ansiedade em animais, podem em grande parte, contribuir para a elucidação da origem e função (normal e patológica) dessas respostas emocionais no homem. De fato, acredita-se que a existência de diversos comportamentos e regiões cerebrais envolvidas pode vir a explicar

a grande variedade de patologias relacionadas aos mecanismos de defesa (Blanchard e cols., 1997).

Uma das maiores dificuldades de se estudar os distúrbios da ansiedade é a ausência de parâmetros que possibilitem a definição e especificação da ansiedade em si. Não há medida operacional para ansiedade, tal como se mede a hipertensão, por exemplo, apesar de alguns indicadores fisiológicos (ex. pressão arterial, hipertermia, taquicardia) poderem auxiliar na avaliação deste estado emocional. Contudo, variações no sistema nervoso autônomo podem ser inapropriadas, podem ocorrer em diversos outros estados emocionais, e não servem para caracterizar os mecanismos cerebrais envolvidos nos distúrbios de ansiedade. Sendo assim, o perfil comportamental parece ser o melhor parâmetro para estudar os distúrbios da ansiedade (Millan, 2003).

Os diversos modelos animais para o estudo da ansiedade podem ser agrupados, em geral, em dois grandes grupos baseados na natureza essencial de estímulo ansiogênico, a saber: (1) estímulos mais artificiais, baseados essencialmente em testes de medo condicionado (ex. choque elétrico e um *puff* de ar nos olhos); e (2) estímulos naturalmente aversivos, como o uso de predadores (ex. Barros e Tomaz, 2002) e interações sociais.

O primeiro tipo de estímulo tem seu uso limitado pela desvantagem do sujeito experimental possivelmente não apresentar um repertório comportamental específico, evolutivamente selecionado, para tais situações, podendo gerar respostas que diferem da ansiedade eliciada na natureza (Hendrie e cols., 1996). Além disso, testes com estímulos aversivos condicionados podem ser influenciados pelos complexos processos de aprendizagem, o que pode dificultar a correta interpretação dos resultados e aumentar o tempo gasto no experimento, pois, o sujeito deve aprender o teste antes dele ser aplicado.

Por sua vez, dentre os estímulos ansiogênicos ditos etológicos para avaliação da ansiedade, vários dos problemas metodológicos se originam da extrema sensibilidade

desses comportamentos aos aspectos relevantes do estímulo e da situação (ex. distância até o sujeito e/ou a movimentação do estímulo - Blanchard e cols., 1997). Neste contexto, o uso de interações sociais apresenta algumas desvantagens em relação ao processo de aprendizagem e memória acerca do animal intruso e a variação comportamental entre animais tratados farmacologicamente que são confrontados com sujeitos não-tratados e vice-versa. Uma possível forma de minimizar esses aspectos seria, por exemplo, o uso de animais treinados/experientes, podendo-se fazer até mesmo uma análise diferenciada entre sujeitos dominantes e subordinados. Contudo, o treino prévio dos sujeitos também possibilita que ocorram aspectos interferentes associados à memória, sendo neste caso a influência das conseqüências do encontro prévio no comportamento de confrontos subseqüentes (Blanchard e cols., 1997).

Diante disso, testes de confronto com um predador se apresentam como uma alternativa interessante para estudos neuropsicofarmacológicos do medo/ansiedade. Nesse caso, um experimentador humano pode atuar como estímulo aversivo, desde que o sujeito não seja altamente domesticado. Além disso, estímulos parciais (ex. cheiro do predador) também geram respostas de defesa apropriadas, podendo até serem mais intensas se associadas ao um conhecimento prévio a cerca do estímulo total (ex. presença do próprio predador – Blanchard e cols., 1997; 2001). Confrontos com predadores apresentam ainda a possibilidade da avaliação de manipulações farmacológicas nos gêneros, apontando possíveis diferenças entre as respostas comportamentais de machos e fêmeas (Blanchard e cols., 1997). No entanto, testes de confronto com predador não escapam das dificuldades, como as já citadas para os procedimentos empregando interações sociais.

Independente da natureza do estímulo utilizado, um teste experimental deve tentar satisfazer alguns critérios, classificados essencialmente como validades teórica, fenomenológica, concorrente e preditiva (Treit, 1985; Zangrossi, 1997). A primeira procura avaliar a similaridade entre os processos neuropsicológicos relacionados à

patologia observada no homem com os que estariam atuando no modelo animal. A maior adversidade de tal critério reside no fato de que nem todos os mecanismos e vias neurais que subsidiam estas respostas estão devidamente esclarecidos, além da dificuldade de se demonstrar claramente a ocorrência de um estado emocional em animais. A do tipo fenomenológica analisa as possíveis semelhanças entre o modelo animal e o distúrbio manifestado no homem, enquanto que a validade concorrente procura determinar a similaridade entre dois ou mais modelos. A validade preditiva, por sua vez, avalia se os efeitos de manipulações farmacológicas ou de lesões cerebrais no modelo animal são semelhantes aos resultados esperados/encontrados em humanos. A possibilidade de se estabelecer resultados falso-negativos ou falso-positivos é apontada como uma das maiores desvantagens de testes baseados essencialmente neste tipo de validação (Treit, 1985).

Vários animais têm sido empregados para se investigar o medo/ansiedade, incluindo diversas espécies de aves (ex. Fluck e cols., 1996), roedores (ex. Graeff e cols., 1998) e primatas não-humanos (ex. Barros e cols., 2000). Apesar dessa diversidade, um foco maior tem sido dado principalmente para algumas espécies de roedores. O mérito desse modelo é indiscutível, tendo dado não somente uma importante contribuição para o nosso entendimento atual dos mecanismos do medo e da ansiedade, mas também para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos dos distúrbios de ansiedade em humanos. Contudo, para minimizar possíveis restrições ao se generalizar para humanos os resultados obtidos com animais, primatas não-humanos têm sido empregados com uma frequência cada vez maior (ex. Barros e cols., 2000).

### **1.2.1 Uso de primatas não-humanos em testes de ansiedade**

O uso de primatas não-humanos como modelos para investigar medo e ansiedade é baseado não apenas na sua proximidade filogenética a humanos, mas também no fato

de que eles exibem respostas comportamentais e fisiológicas semelhantes à de humanos, quando a ansiedade é induzida experimentalmente (Vellucci, 1990; Newman e Farley, 1995). Ademais, a complexidade do cérebro de primatas não-humanos e a sua semelhança ao do homem colaboram para o uso desses sujeitos em experimentos para investigar os mecanismos neurobiológicos das emoções humanas, como o medo e a ansiedade. De fato, várias espécies de primatas não-humanos têm sido utilizadas como último passo em ensaios pré-clínicos para averiguar a segurança e eficácia de novos tratamentos farmacológicos antes destes compostos serem testados em humanos (ex. King e cols., 1988).

Porém, muitas são as dificuldades em se trabalhar com esses animais. A exigência de uma dieta especial, espaço, higiene e complexas interações sociais são parâmetros importantes que precisam ser levados em consideração a fim de evitar anormalidades comportamentais e fisiológicas (Stellar, 1960; Sainsbury e cols., 1990; Kitchen e Martin, 1996; King e cols., 1988). Neste contexto, e com o intuito de se minimizar as dificuldades relacionadas ao custo e à manutenção de primatas não-humanos em cativeiros, surgiu, nas últimas duas décadas, um interesse especial pelas espécies do Novo Mundo, correspondente àquelas que ocorrem na América Central e América do Sul.

O gênero *Callithrix*, particularmente, pode ser encontrado habitando diversas regiões, desde a bacia Amazônica e Mata Atlântica até o cerrado do Planalto Central. Apesar da grande destruição do seu habitat e conseqüente risco de extinção, as espécies *Callithrix jacchus* (mico-comum) e *C. penicillata* (mico-estrela) nunca foram consideradas ameaçadas ou estiveram vulneráveis à extinção. Essas duas espécies são ainda conhecidas por habitarem regiões caracteristicamente inóspitas (cerrado e caatinga) e se adaptam facilmente ao cativeiro, em comparação a outros símios (Sussman e Kinzey, 1984; Stevenson e Rylands, 1988).

Este gênero, pertencente à família dos calitriquídeos, pesa entre 250–450g quando adulto, tem uma expectativa de vida de 10-12 anos em cativeiro, atinge a maturidade sexual aos 12-18 meses, sua gestação dura aproximadamente 145 dias, dando a luz a gêmeos e apresenta um estro pós-parto (Epple, 1975; Sussman e Kinzey, 1984; Tardif e cols., 1986; Goldizen, 1987; Stevenson e Rylands, 1988). Além disso, estes pequenos primatas neotropias possuem um sistema nervoso que se assemelha ao dos demais antropóides (Reis e Erhaht, 1979).

Os calitriquídeos também apresentam uma variedade de respostas comportamentais quando deparados com diferentes situações ambientais, sendo o perfil geral ainda presente em micos mantidos em cativeiro (Stevenson e Rylands, 1988). Em diversos tipos de situações de ameaça (ex. confronto com predador, interações co-específicas), mais especificamente, estes pequenos primatas apresentam um repertório comportamental complexo, mas facilmente discernível, variando desde expressões faciais (ex. *slit-stare*, *flat tufts*) e vocalizações específicas (ex. *tsik-tsik*), até alterações posturais (ex. coçar, marcação-de-cheiro, catação e exposição genital) (revisado em: Barros e cols., 2002).

Este vasto repertório comportamental, juntamente ao baixo custo de manutenção, fácil manejo, adaptabilidade ao cativeiro e alta taxa reprodutiva, vêm contribuindo para o estabelecimento desses símios como sujeitos experimentais em investigações biomédicas, comportamentais e neuropsicofarmacológicas (Barros e Tomaz, 2002).

### **1.2.2. Testes de medo/ansiedade em primatas**

Em primatas não-humanos, vários testes têm sido validados. Tais procedimentos experimentais, assim como visto na seção 1.2., podem ser agrupados em: (1) testes de respostas condicionadas (ex. choque elétrico e *puff* de ar nos olhos – Rowlett e cols., 2005); e (2) testes de respostas inatas, tais como: interação social (ex. Cilia e Piper, 2005);

1997), isolamento social (ex. Kalin e cols., 1987), 'ameaça humana' (ex Carey e cols., 1992) e confronto com predador (ex. Barros e Tomaz, 2002). Dentre os de respostas condicionadas, destaca-se o teste de reflexo acústico condicionado em macacos rhesus, recentemente validado por Winslow e cols (2002) e que, posteriormente, mostrou-se sensível a manipulações com DZP e morfina (Winslow e cols, 2007). Visto que testes de resposta condicionada necessitam de uma fase de aprendizado (pré-treino) e de um grau de motivação, podem empregar estímulos dolorosos e não apresentam respostas de linha de base (Rodgers e cols., 1997), testes mais etologicamente-baseados – que avaliam respostas inatas – também foram desenvolvidos para primatas não-humanos.

Os testes etológicos de interação/isolamento social estão baseados no fato de primatas não-humanos serem animais altamente sociais, variando desde alianças temporárias, até a formação de pares monogâmicos duradouros (Cheney e Wrangham, 1987). Apesar de validados comportamental e farmacologicamente, estes testes não vêm sendo muito empregados no âmbito de se investigar os mecanismos diretamente relacionados ao medo/ansiedade, sendo bastante utilizados para uma avaliação psicológica e fisiológica do comportamento afetivo (revisado em Gilmer e McKinney, 2003).

A 'ameaça humana' e confronto com predador, por sua vez, são testes que se baseiam na interação presa-predador como fonte indutora de medo/ansiedade nos animais. Uma vez que primatas são fundamentalmente dependentes de estratégias comportamentais para se defenderem de diversos tipos de predadores (Barros e cols., 2004), e que comportamentos de defesa são vistos como possíveis 'precursores evolutivos' dos distúrbios de ansiedade em humanos (Deakin e Graeff, 1991; Nesse, 1999), não é surpreendente o uso de 'predadores' como uma estratégia experimental para se induzir ansiedade nesses animais.

O teste da Ameaça Humana (AH) é atualmente um dos procedimentos mais empregados em primatas, devido, em parte, a sua simplicidade e baixo custo. Em micos, foi inicialmente desenvolvido e validado por Costall e cols. (1988), estando baseado

essencialmente no fato da mera presença de um experimentador ser capaz de induzir ataques defensivos e respostas associadas ao medo/ansiedade nesses primatas. De fato, o perfil comportamental induzido neste teste foi revertido pela administração de diversos compostos ansiolíticos clássicos (ex. DZP, buspirona), mas não por outras substâncias psicoativas (ex. anfetamina e cafeína; Carey e cols., 1992). Por exemplo, a administração de DZP antagonizou, principalmente, o aumento no número de posturas agressivas, como a exposição genital, como também diminuiu o tempo de proximidade ao experimentador (Costall e cols., 1988; Carey e cols., 1992).

Contudo, questões como a influência da domesticação de animais cativos, o número reduzido de comportamentos indicadores de medo/ansiedade, e uma possível habituação ao estímulo (homem), devem ser levados em conta ao se interpretar e generalizar os resultados obtidos com este teste (Barros e Tomaz, 2002). Ademais, nas condições do teste de AH, os sujeitos podem não apresentar um repertório comportamental específico, evolutivamente selecionado, visto que um experimentador humano não é essencialmente um predador natural de primatas não-humanos. Tal aspecto pode gerar, em um ambiente laboratorial, uma ativação neuronal e conseqüentes respostas comportamentais que diferem da ansiedade normalmente eliciada na natureza (Blanchard e cols., 1997).

O teste de Confronto com Predador (CP), por outro lado, foi recentemente desenvolvido e validado por Barros e cols. (2000) para investigar, de forma mais natural, as respostas de medo/ansiedade de micos-estrela. O teste consiste essencialmente em confrontar, individualmente, este pequeno primata com um gato-pintado-do-mato (*Felis tigrina*) taxidermizado, dentro de um ambiente de labirinto ao qual o sujeito foi previamente habituado. Dentre vários tipos de potenciais predadores, este estímulo – comumente encontrado no ambiente natural destes símios – induziu comportamentos de defesa de forma mais pronunciada, significativa e duradoura (Barros e cols., 2000). Na tentativa também de se aproximar ainda mais essa situação experimental ao que seria

encontrado na natureza, o contato visual com o gato-pintado ocorre através da própria atividade locomotora/exploratória do sujeito no ambiente do labirinto.

De fato, um confronto agudo com o gato taxidermizado gerou comportamentos característicos à exposição a um predador (Stevenson e Rylands, 1988), induzindo uma resposta de evitação ao estímulo (*proximic avoidance*), e elevando as taxas de vigilância e de outras reações associadas ao medo/ansiedade em micos (ex. *swaying*, *tongue in-out*), além da vocalização de alarme *tsik-tsik* (Barros e cols., 2004). Por outro lado, também foi observada uma diminuição nas atividades exploratórias (ex. farejar/lamber o labirinto, *leg stand*) e na vocalização de contato social *long-call*. Em termos farmacológicos, a administração de DZP (Barros e cols., 2000) e buspirona (Barros e cols., 2001) reverteram comportamentos de medo/ansiedade induzidos pela presença do predador, visto que houve uma diminuição na marcação-de-cheiro e coçar, assim como um aumento na proximidade ao predador e exploração. Resultados semelhantes também já foram encontrados com o uso do neuropeptídeo substância P (SP<sub>1-7</sub>; Barros e cols., 2002b) e com o antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY 100635 (Barros e cols., 2003).

Apesar de sua validação comportamental e farmacológica, alguns aspectos metodológicos do teste de CP devem ser considerados, como a duração e frequência do confronto com o estímulo aversivo. Em termos da duração e frequência, exposições longas (ex. 30-min) e muito frequentes (>2x por semana) não parecem ser o que se observa comumente na natureza (ex. Heymann, 1987; Ferrari e Lopes Ferrari, 1990). Nestas condições, pode haver uma habituação das respostas que normalmente ocorrem frente a um estímulo indicativo da presença do predador, como um *playback* de vocalizações específicas, um odor ou um predador taxidermizado. De fato, confrontos repetidos com o gato-pintado taxidermizado no ambiente do labirinto levaram a uma habituação rápida e completa de alguns comportamentos indicativos de medo/ansiedade no teste de CP (ex. vocalização *tsik-tsik*), enquanto que para outros, o processo ocorreu gradualmente (ex. vigilância, exploração) (Barros e cols., 2004). Poucos foram os

indicadores comportamentais (ex. proximidade ao predador) que não retornaram à linha de base após uma série de confrontos (Barros e cols., 2004) ou meses após terem sido expostos a este estímulo (Barros e cols., 2007). Uma exposição rápida (< 5-min) ao gato taxidermizado também parece induzir respostas apropriadas de medo/ansiedade em micos cativos (Barros e cols., 2002; Dacier e cols., 2006), apesar do fato que após uma série freqüente destes confrontos, alguns aspectos do comportamento de vigilância habituaram (Dacier e cols., 2006).

No teste de CP, o local onde ocorrem os confrontos também consiste em um aspecto metodológico a ser considerado, uma vez que ambientes novos *per se* são altamente aversivos para calitriquídeos (ex. Johnson e cols., 1996). Apesar de serem expostos ao ambiente do labirinto, antes de qualquer confronto com o gato taxidermizado, não se pode afirmar que os sujeitos se encontram totalmente habituados (comportamental e fisiologicamente) a este ambiente. Ademais, o isolamento social curto (<30-min) ao qual os sujeitos são submetidos, uma vez que são testados individualmente, também pode influenciar a resposta comportamental e fisiológica observada neste teste.

Portanto, procedimentos realizados no próprio viveiro de moradia do sujeito, empregando uma exposição rápida (<5-min) ao estímulo naturalmente aversivo, e com intervalo de tempo significativo entre cada confronto podem ser mais apropriados para primatas não-humanos. Tais parâmetros podem: 1) minimizar a influência de uma exposição a um ambiente novo nos dados comportamentais observados, 2) diminuir a habituação das respostas induzidas pela presença do estímulo, e 3) melhor reproduzir o que realmente acontece (e foi selecionado) na natureza.

Sendo assim, os testes de medo/ansiedade atualmente disponíveis para primatas não-humanos, e principalmente calitriquídeos, precisam ser melhor avaliados em termos de sua validade fenomenológica e ecológica, assim como se beneficiariam de novos indicadores comportamentais do estado emocional sendo investigado.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os distúrbios de ansiedade apresentam uma alta prevalência na nossa sociedade, uma vez que afligem diversas faixas etárias (incluindo crianças e idosos), homens e mulheres, e níveis sócio-econômicos diferentes (Brandão, 2001). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2001), cerca de 8% das pessoas que procuram os serviços médicos primários, são diagnosticadas com DAG. No Brasil, esse número chega a 22%. Contudo, as opções para o seu tratamento ainda são restritas, visto que nem todos os mecanismos neurais associados às respostas comportamentais e fisiológicas destes distúrbios estão suficientemente esclarecidos. Neste contexto, não é de se surpreender que os tratamentos atualmente existentes, principalmente os medicamentos da classe dos benzodiazepínicos, apresentam muitos efeitos colaterais. Sendo assim, há uma necessidade de se realizar novos estudos a cerca das bases neuropsicobiológicas da ansiedade – normal e patológica, assim como de se desenvolver novos alvos terapêuticos, mais seletivos e com menos efeitos adversos, para o tratamento dos distúrbios a ela associados.

Para tanto, trabalhos empregando animais são de suma importância, podendo os resultados, na maioria das vezes, serem extrapolados para humanos. Neste sentido, estudos utilizando estratégias etológicas merecem destaque, visto que aproximam a condição experimental com a que foi selecionada na natureza. Contudo, a fim de minimizar possíveis restrições no uso de animais, primatas não-humanos são sujeitos ímpares para elucidar os mecanismos da ansiedade normal e patológica. Apesar de serem ainda pouco empregados, os símios permitem uma extrapolação mais fidedigna e realista do que ocorre no homem, além de apresentarem vários indicadores comportamentais do seu estado emocional. De fato, as reações de medo/ansiedade em calitriquídeos já foram estabelecidas – em animais selvagens e cativos – permitindo um estudo mais amplo e aprofundado dos efeitos de uma

---

ameaça de predação e de manipulações farmacológicas, o que facilita o estudo de aspectos neuropsicofarmacológicos. Esta possibilidade de avaliar um amplo espectro de indicadores comportamentais é de grande importância, visto que diferentes aspectos de uma mesma patologia podem responder de forma diferente a uma mesma manipulação farmacológica. Além disso, através de diferentes manipulações farmacológicas, pode-se modular vias neurotransmissoras distintas, o que resulta em um diferente repertório comportamental.

Dentre os procedimentos experimentais mais empregados para avaliar o medo e a ansiedade em primatas, destacam-se os testes utilizando como ameaça um experimentador humano (Costall e cols., 1988) e um predador taxidermizado (Barros e cols., 2000). Apesar de bem validados, alguns aspectos metodológicos destes testes ainda precisam ser melhor avaliados. A realização desses testes em um ambiente social altamente familiar (ex. viveiro de moradia), assim como empregar confrontos rápidos e bem espaçados, pode contribuir para a validade fenomenológica e preditiva dos resultados já obtidos. Ademais, novos potenciais indicadores comportamentais (ex. vigilância) precisam ser avaliados nestes dois testes, principalmente em termos de sua sensibilidade a manipulações farmacológicas. Finalmente, ainda não foi realizado nenhum estudo específico, sob condições experimentais equivalentes (ou até mesmo semelhantes), verificando a validade concorrente entre os testes de AH e CP em primatas não-humanos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Este estudo teve como objetivo geral investigar as respostas comportamentais de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) submetidos a dois testes experimentais de medo/ansiedade: os testes da Ameaça Humana e do Confronto com Predador, sob o efeito da administração do benzodiazepínico diazepam.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Este trabalho se propôs, especificamente, a:

- avaliar as respostas comportamentais de micos-estrela (em seus próprios viveiros de moradia) antes, durante e após uma rápida exposição a um experimentador humano (teste de AH) e a um predador taxidermizado (teste de CP);
- investigar o efeito da administração sistêmica aguda do benzodiazepínico diazepam sobre as respostas comportamentais dos micos-estrela submetidos as mesmas duas condições experimentais acima descritas;
- verificar a viabilidade de se empregar as respostas comportamentais de vigilância como novos indicadores comportamentais de medo/ansiedade nos dois testes sendo avaliados;
- estabelecer a validade concorrente entre os dois testes de AH e CP para avaliação de medo/ansiedade em micos-estrela.

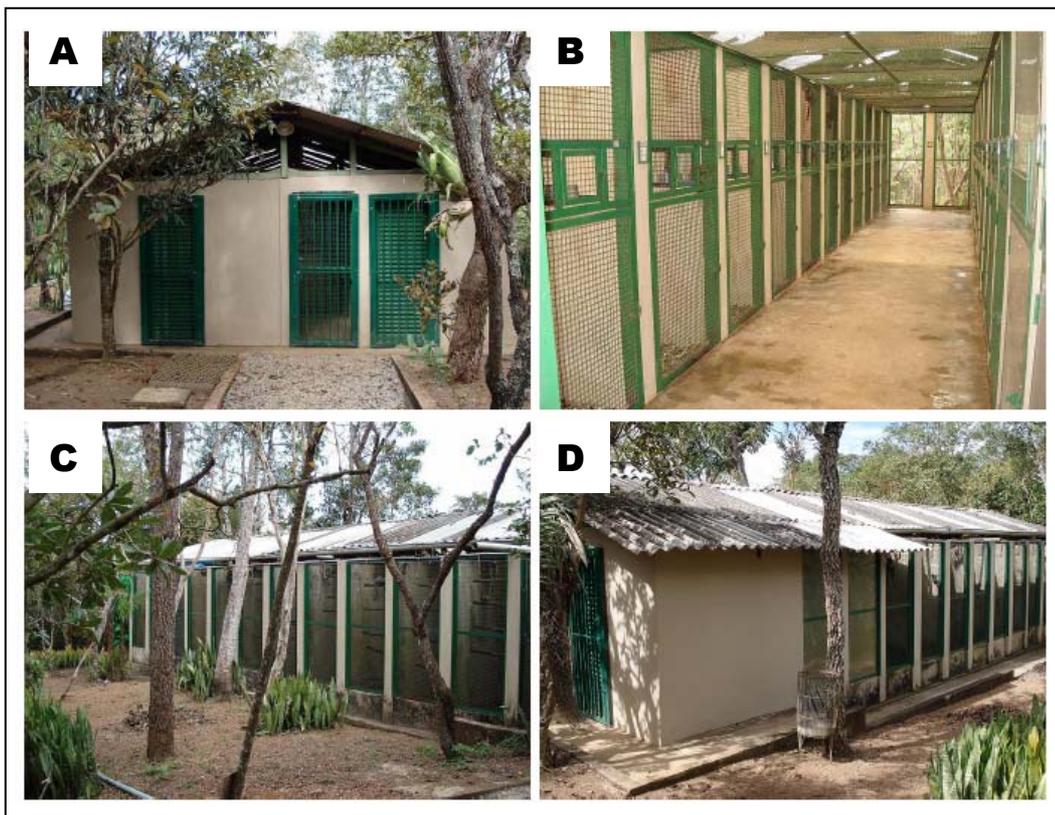
## **4. METODOLOGIA**

Todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Anexo 1). O presente estudo foi dividido em dois experimentos, descritos a seguir:

### **4.1. EXPERIMENTO 1**

#### **4.1.1. Sujeitos**

Foram utilizados treze micos-estrela adultos (7 fêmeas; 6 machos) da espécie *Callithrix penicillata* (vide Anexo 2; peso: 285 - 415g), alojados no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB). Este é credenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA como criadouro de primatas para fins científicos (Registro IBAMA, 1/53/1999/000006-2). Os animais foram mantidos no Pavilhão Central do CPUnB sobre condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade, em casais heterossexuais, em viveiros-padrão (1,3 m de largura x 2 m de comprimento x 2 m de altura). O Pavilhão Central possui dois corredores com doze viveiros cada, separados por um corredor de segurança (Figura 5). Cada viveiro possui uma caixa-ninho suspensa, um pote de alumínio para alimentos frescos, um tubo de PVC para ração seca; uma plataforma de alumínio suspensa e balanços feitos com madeiras naturais em diversas alturas. Os viveiros são formados por duas paredes de concreto paralelas e três telas de arame (malha: 2,5 cm<sup>2</sup>), formando a frente, o fundo e o teto. Este último é ainda coberto por telha Eternite® intercalada com telha transparente, cobrindo dois terços do Pavilhão Central a partir do corredor de segurança (Figura 5). Desta forma os viveiros ficam com uma área livre aberta. O chão é de terra, coberto com folhas naturais secas.



**Figura 5.** Fotografias do Pavilhão Central do CPUnB. (A) Vista frontal do pavilhão: porta de acesso ao pavilhão; (B) Vista interna do pavilhão: corredor e disposição dos viveiros, (C) Vista de um viveiro típico; e (D) Vista lateral do pavilhão.

Ao longo do estudo, os animais foram acompanhados por um médico veterinário, assim como pesados e avaliados no início de cada mês. Diariamente, das 07:30 às 17:00h, os animais receberam frutas, vegetais frescos e ração a vontade. Peito de frango, ovos cozidos e larvas de tenébrio foram fornecidos esporadicamente, enquanto que água estava sempre disponível. Durante todo o experimento, a rotina de manejo já estabelecida no CPUnB para os calitriquídeos foi mantida.

O procedimento experimental descrito abaixo também foi realizado no CPUnB, sendo os micos testados em seus próprios viveiros de moradia. Animais de um mesmo viveiro foram testados e observados simultaneamente.

### 4.1.2. Droga

Neste estudo, foi utilizado o benzodiazepínico diazepam (Diazepamil<sup>®</sup>; Hipolabor, Brasil). O fármaco foi dissolvido em solução salina (0,9% NaCl – uso comercial) com 0,01% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA) e administrado por via intraperitoneal (ip) nas doses de 1, 2 e 3 mg/kg e no volume de 1 ml/kg. Como controle, foi administrado a mesma solução de salina com 0,01% de Tween 80. As doses empregadas neste estudo foram baseadas em trabalhos anteriores com micos-estrela submetidos ao teste de Confronto com Predador (Barros e cols., 2000; 2002).

### 4.1.3. Procedimento Experimental

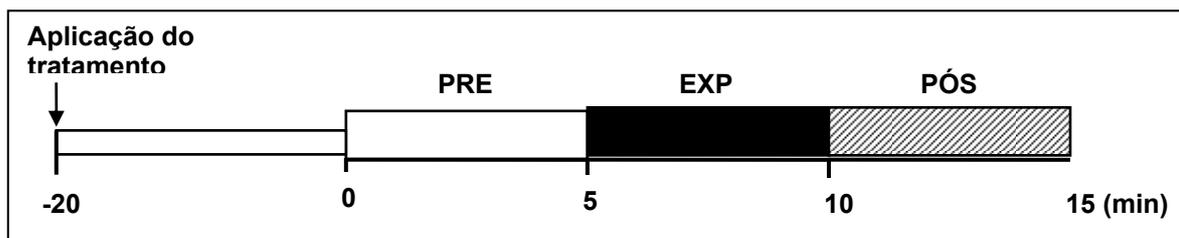
O procedimento experimental foi dividido em duas fases consecutivas, descritas a seguir:

#### FASE 1: HABITUAÇÃO

Essa fase teve como objetivo habituar os animais à presença dos observadores e dos equipamentos para observação do comportamento. Para tanto foram realizadas quatro sessões (H1; H2; H3; H4), em intervalos de 48 h. Em cada sessão os dois sujeitos de um mesmo viveiro foram observados simultaneamente por 15 min, divididos em três intervalos consecutivos (PRE, EXP e POS; Figura 6). Estes serviram apenas para acompanhar a mesma divisão em três intervalos das sessões da Fase 2 a seguir, facilitando assim a comparação dos resultados obtidos nessas duas fases do Experimento 1, uma vez que nesta primeira fase os animais não foram manipulados nem expostos a estímulos aversivos.

As observações comportamentais foram realizadas em tempo real por dois observadores posicionados no corredor de segurança do Pavilhão Central dos Micos do CPUUnB e a uma distância de 2 m da tela frontal do viveiro. Contudo, cada observador registrou, em um *laptop*, os comportamentos de interesse de um único sujeito. A ordem

na qual os sujeitos de diferentes viveiros foram observados variou aleatoriamente em cada dia de teste, sendo as sessões realizadas entre as 08:00 e 10:00 h. Para isolar visualmente os animais sendo testados dos demais calitriquídeos do pavilhão, foi colocado um sistema de cortinas ao redor de todo o *setup* experimental.



**Figura 6.** Representação esquemática de uma sessão experimental de 15 min da Fase 1 do procedimento experimental para habituação dos micos aos observadores e dos equipamentos para observação do comportamento.

## FASE 2: CONFRONTO

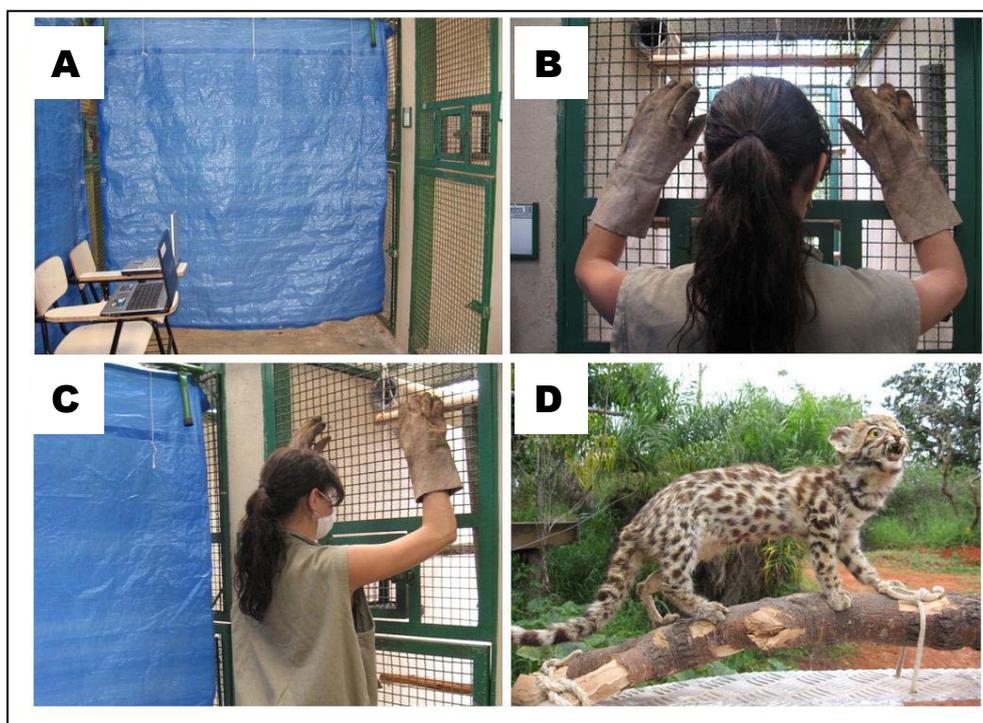
Essa fase, iniciada 48 h após a última sessão da Fase 1 (H 4), teve como objetivo avaliar as respostas comportamentais dos animais submetidos – em seus próprios viveiros de moradia – a dois diferentes testes de medo/ansiedade: (1) Ameaça Humana (AH), onde o sujeito foi exposto a um experimentador, e (2) Confronto com Predador (CP), onde o mico foi confrontado com um predador taxidermizado (*Leopardus tigrinus*). Para tanto, os animais foram randomicamente divididos em dois grupos experimentais, sendo o primeiro grupo submetido inicialmente ao teste AH e 15 dias depois ao CP, enquanto o segundo grupo foi exposto primeiramente ao teste CP e após 15 dias ao AH. Os animais de um mesmo viveiro foram necessariamente alocados no mesmo grupo experimental.

Para cada um dos 2 estímulos/testes, cada sujeito foi pseudo-randomicamente submetido a quatro sessões de confronto, em intervalos de 4 dias, a saber: 0, 1, 2 e 3 mg/kg de diazepam (DZP0, DZP1, DZP2 e DZP3). Desta forma, ao final do Experimento

1, cada sujeito foi submetido a oito sessões de confronto: quatro para o teste AH e quatro para o CP.

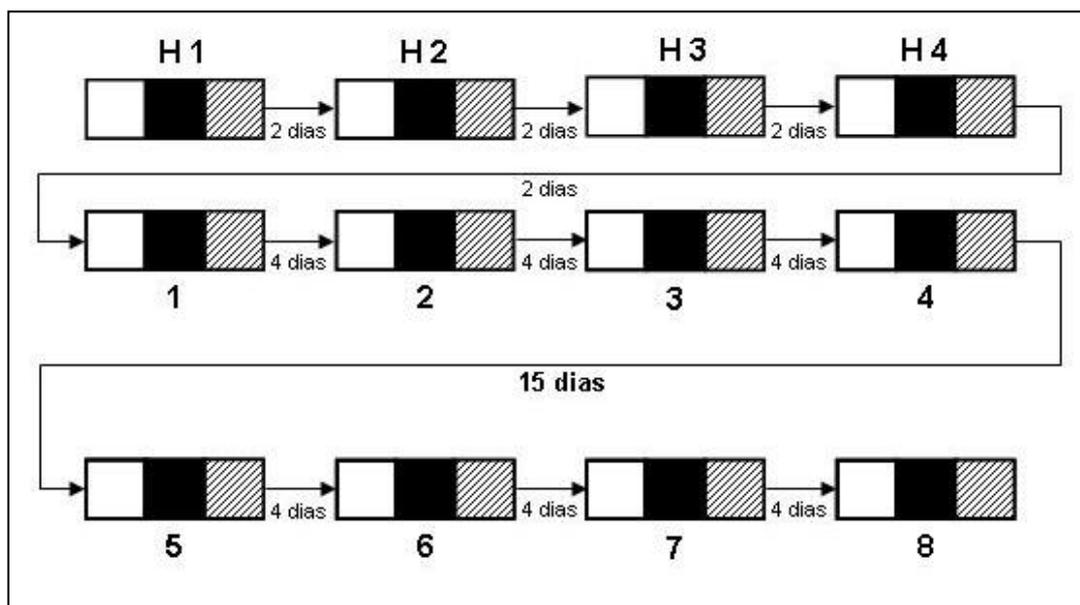
Antes do início de cada sessão, o sujeito foi capturado em seu viveiro de moradia pelo experimentador, com o auxílio de uma rede e luvas de couro, sendo em seguida imobilizado para administração ip do tratamento pré-estabelecido e finalmente liberado de volta ao seu viveiro. Após um intervalo de 20 min, deu-se início de fato a observação comportamental, seguindo o mesmo procedimento descrito acima nas sessões de habituação. Desta forma, cada sessão de confronto de 15 min foi dividida em três intervalos consecutivos de 5 min cada: pré-exposição (PRE), exposição (EXP) e pós-exposição (POS). No primeiro intervalo, foi obtida uma linha de base do comportamento do sujeito durante 5 min. Em seguida um dos estímulos sendo testado – experimentador ou predador taxidermizado – foi posicionado próximo à tela frontal do viveiro. O predador, que foi taxidermizado em uma posição de ataque/ameaça e fixado a um galho de árvore, foi colocado a 1 m de altura com auxílio de um suporte, enquanto que o experimentador permaneceu de pé, imóvel, evitando olhar diretamente ao sujeito e com as mãos erguidas na altura da cabeça, usando as mesmas luvas usadas para a captura (Figura 7).

Vale ressaltar que o experimentador consistiu na mesma pessoa responsável pela captura do sujeito para administração do tratamento. Após o rápido posicionamento de um dos estímulos aversivos, deu-se início ao intervalo de 5-min de exposição. Ao final do mesmo, o estímulo foi rapidamente retirado, sendo o comportamento do sujeito observado por mais 5 min, correspondendo ao intervalo de pós-exposição.



**Figura 7.** Fotografias do procedimento experimental. (A) Equipamento de observação e isolamento visual; (B) Vista interna do local de observação, teste de ameaça humana; (C) Experimentador; e (D) Gato taxidermizado.

As observações comportamentais também foram realizadas em tempo real por outros dois observadores sentados a uma distância de 2 m da tela frontal do viveiro, ou seja, a aproximadamente 1,5 m atrás do estímulo. Contudo, cada observador registrou, em um *laptop*, os comportamentos de interesse de um único sujeito. Vale ressaltar que os animais de um mesmo viveiro foram observados simultaneamente, e em cada dia de teste receberam necessariamente o mesmo tratamento. A ordem na qual os sujeitos dos diferentes viveiros foram observados variou aleatoriamente em cada dia de teste, sendo as sessões realizadas entre as 08:00 e 10:00 h. Para isolar visualmente os animais sendo testados dos demais calitriquídeos do pavilhão, foi colocado um sistema de cortinas ao redor de todo o equipamento experimental.



**Figura 8.** Representação esquemática da sequência de sessões realizada no Experimento 1, incluindo as quatro sessões de habituação (H1 – H4) iniciais da Fase 1, as oito sessões de confronto com um estímulo aversivo (1-8; sendo quatro para cada estímulo testado) da Fase 2, e a divisão de cada sessão em três intervalos consecutivos de 5-min (branco=pré-exposição, preto=exposição, hachurado=pós-exposição).

#### 4.1.4. Análise Comportamental

Os comportamentos foram registrados por observadores previamente treinados, tendo-se uma confiabilidade inter-observador de 95%, através do programa Etholog® versão 2.2.5 (Departamento de Psicologia Experimental, Universidade de São Paulo, Brasil; *freeware*). Nas sessões de confronto, os observadores não tinham conhecimento prévio do tratamento ao qual o sujeito havia sido submetido. Uma descrição detalhada dos comportamentos analisados encontra-se na Tabela 2, abaixo.

## 4.2. EXPERIMENTO 2

A análise dos resultados do Experimento 1 revelou que as doses de diazepam utilizadas haviam gerado um efeito sedativo significativo, o que por sua vez impossibilitou uma real interpretação do possível efeito ansiolítico nos dois testes de medo/ansiedade

sendo avaliados nos micos (vide item 5.1). Desta forma, foi realizado um novo experimento com o intuito de avaliar as respostas comportamentais de micos-estrela submetidos aos mesmos dois testes de medo/ansiedade (AH e CP), mas agora empregando doses menores do mesmo fármaco.

#### **4.2.1. Sujeitos**

Foram empregados dez micos-estrela adultos (5 fêmeas e 5 machos) da espécie *Callithrix penicillata* (305-455g), também provenientes do CPUnB e mantidos nas mesmas condições que os animais do experimento anterior (item 4.1.1). Dentre os sujeitos empregados neste segundo experimento, cinco haviam sido usados no estudo anterior, enquanto que os outros cinco tinham sido usados em outros tipos de investigações no CPUnB (Anexo 2).

#### **4.2.2. Droga**

Foi utilizado novamente o benzodiazepínico diazepam (Compaz<sup>®</sup>; Cristália; Brasil), dissolvido em solução salina (0,9% NaCl – uso comercial) com 0,01% de Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA) e administrado por via ip nas doses de 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg e no volume de 1 ml/kg. Como controle, também foi administrado a mesma solução de salina com 0,01% de Tween 80. As doses empregadas neste estudo foram baseadas em trabalhos anteriores com calitriquídeos submetidos ao teste de AH (Carey e cols., 1992).

**Tabela 2.** Descrição dos parâmetros comportamentais avaliados nos micos-estrela submetidos aos testes de medo/ansiedade de Ameaça Humana e Confronto com Predador\*.

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
<b>Locomoção</b>	tempo total se deslocando, sendo considerado como um episódio o deslocamento $\geq 2$ s ou por uma distância maior que a medida da metade do corpo
<b>Comportamentos deslocados</b>	frequência dos comportamentos de coçar (movimentar rapidamente e repetitivamente as mãos ou os pés contra o pelo), catar (movimentar precisamente e lentamente as mãos contra o pelo) e fazer marcação-de-cheiro (friccionar a região circumgenital em qualquer substrato)
<b>Monitoramento aéreo</b>	frequência e duração da varredura contínua do ambiente ou outros movimentos visíveis de cabeça direcionada ao ambiente, do plano horizontal para cima, persistindo por $\geq 5$ s, enquanto o sujeito permanece parado
<b>Monitoramento terrestre</b>	frequência e duração da varredura contínua do ambiente ou outros movimentos visíveis de cabeça direcionada ao ambiente, abaixo plano horizontal, persistindo por $\geq 5$ s, enquanto o sujeito permanece parado
<b>Olhar aéreo Rápido</b>	frequência da observação rápida do ambiente através da movimentação da cabeça com duração $< 5$ s, do plano horizontal ou acima
<b>Olhar terrestre rápido</b>	frequência da observação rápida do ambiente através da movimentação da cabeça com duração $< 5$ s, abaixo do plano horizontal
<b>Olhar direto</b>	frequência da observação rápida e direta ao estímulo (experimentador ou predador)
<b>Vocalização**</b>	duração da vocalização de alarme do tipo <i>tsik-tsik</i>
<b>Proximidade** ***</b>	tempo de permanência na tela frontal do viveiro

\* A descrição dos comportamentos foi baseada em etogramas de micos (Stevenson & Rylands, 1988), e estudos anteriores (Barros e cols., 2000, 2001, 2002, 2003, 2004; Caine, 1984; e Koenig, 1998).

\*\* parâmetros avaliados apenas no Experimento 2

\*\*\* parâmetro avaliado manualmente com um cronômetro

### 4.2.3. Procedimento Experimental

Assim como no primeiro experimento, os micos foram testados em seus próprios viveiros de moradia. O procedimento desse experimento foi dividido em quatro fases (Figura 9), todas realizadas entre as 10:00 e 12:00 h, descritas a seguir:

### **FASE 1: HABITUAÇÃO 1**

Nesta fase foram realizadas duas sessões de habituação (H1 e H2) para cada sujeito, em um intervalo de 24 h, seguindo o mesmo procedimento experimental descrito acima para as sessões de habituação do Experimento 1.

### **FASE 2: CONFRONTO 1 (teste de AH)**

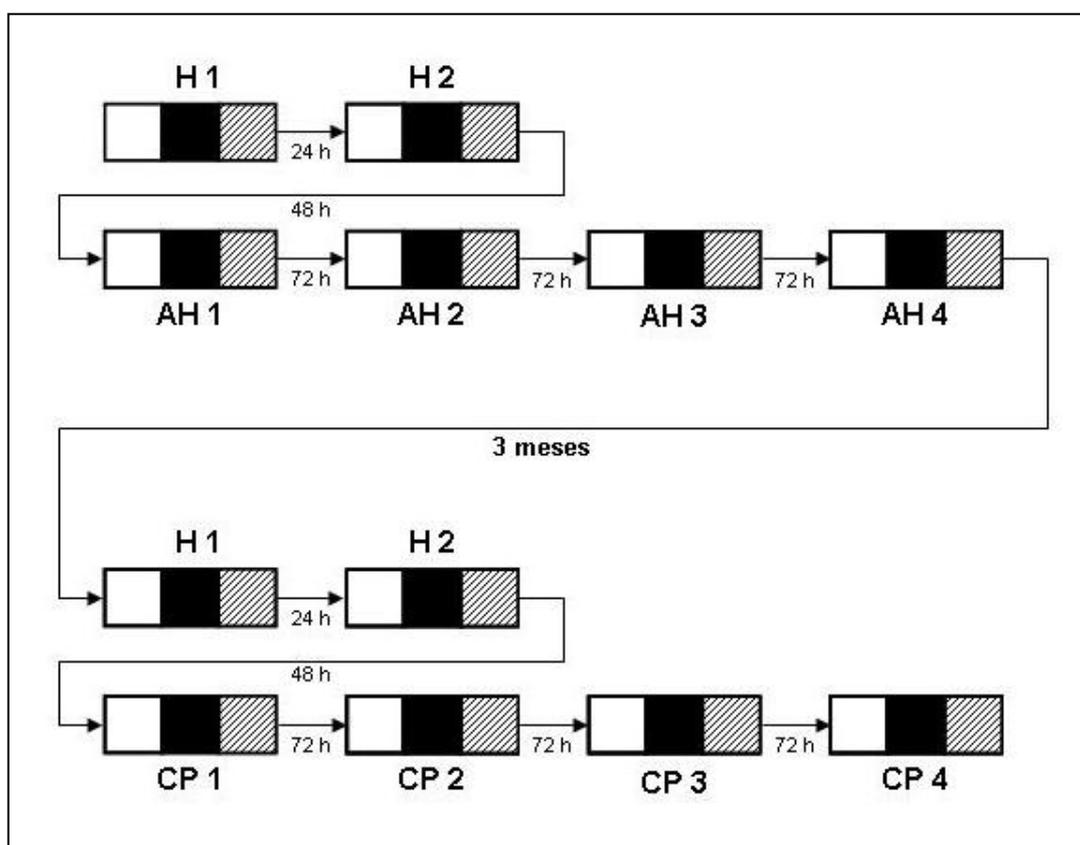
Nesta fase, que teve início 48 h após a última sessão de habituação (H2), cada sujeito foi submetido ao teste de AH. Para tanto, foram realizadas quatro sessões de confronto com cada sujeito, em intervalos de 72 h, nas quais foram administrados os seguintes tratamentos de forma pseudo-randômica: 0; 0,10; 0,25 e 0,50g/kg de diazepam (DZP0; DZP0,10; DZP0,25 e DZP0,50). O procedimento empregado nesta fase do Experimento 2 seguiu o mesmo descrito acima para as sessões de confronto do Experimento 1.

### **FASE 3: HABITUAÇÃO 2**

Após um intervalo de aproximadamente 3 meses, os mesmos sujeitos foram novamente submetidos a duas sessões de habituação (H1 e H2), realizadas em um intervalo de 24 h. O procedimento experimental também foi o mesmo que o descrito acima para sessões de habituação do Experimento 1.

### **FASE 4: CONFRONTO 2 (teste de CP)**

Nesta última fase, que também teve início 48 h após a última sessão de habituação (H2), cada sujeito foi submetido ao teste de CP. Para tanto, foram realizadas mais quatro sessões de confronto com cada sujeito, em intervalos de 72 h, nas quais foram administrados os mesmos tratamentos da Fase 2 acima. O procedimento empregado nesta fase também seguiu o mesmo descrito acima para as sessões de confronto do Experimento 1.



**Figura 9.** Representação esquemática da sequência de sessões realizada no Experimento 2, incluindo: 1) as duas sessões de habituação (H1-H2) iniciais da Fase 1, 2) as quatro sessões de confronto do teste de Ameaça Humana (AH1-AH4) da Fase 2, 3) as duas sessões de habituação da Fase 3 (H1-H2), 4) as quatro sessões de confronto do teste de Confronto com Predador (CP1-CP4) da Fase 4, e a divisão de cada sessão em três intervalos consecutivos de 5-min (branco=pré-exposição, preto=exposição, hachurado=pós-exposição).

#### 4.2.4. Análise Comportamental

A análise comportamental do experimento 2 se deu da mesma forma que descrita para o Experimento 1 (vide 4.1.4), tendo sido incluído porém dois novos parâmetros, a saber: vocalização e proximidade (vide Tabela 2). Ademais, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os estímulos aversivos utilizados nos dois testes, as respostas comportamentais observadas apenas durante o confronto (intervalo EXP) de todas as sessões experimentais de um teste foram comparadas ao mesmo intervalo do outro teste.

### 4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de cada parâmetro comportamental foram analisados para se detectar possíveis diferenças entre: 1) as quatro sessões de habituação (H1-H4); 2) as quatro sessões de confronto de cada estímulo testado (0, 1, 2 e 3 mg/kg de DZP no Experimento 1 e 0, 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg de DZP no Experimento 2) juntamente com a última sessão de habituação (H4 ou H2, respectivamente); 3) os três intervalos de cada sessão (pré-exposição, exposição e pós-exposição); e 4) os intervalos de EXP entre os dois tipos de teste de medo/ansiedade. Para tanto, os dados foram analisados por meio de uma Análise de Variância para amostras repetidas (*two-way repeated measures ANOVA*), sendo a sessão experimental e o intervalo das sessões usados como variáveis independentes (itens 1, 2 e 3) ou a sessão experimental e o tipo de teste (AH ou CP; item 4). Resultados significativos foram seguidos pelos testes *post hoc* de: 1) Dunnett, quando detectado diferenças entre as sessões de habituação ou as de confronto, ou de 2) Tukey, quando observado uma diferença entre os intervalos de cada sessões. O nível de significância adotado em todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

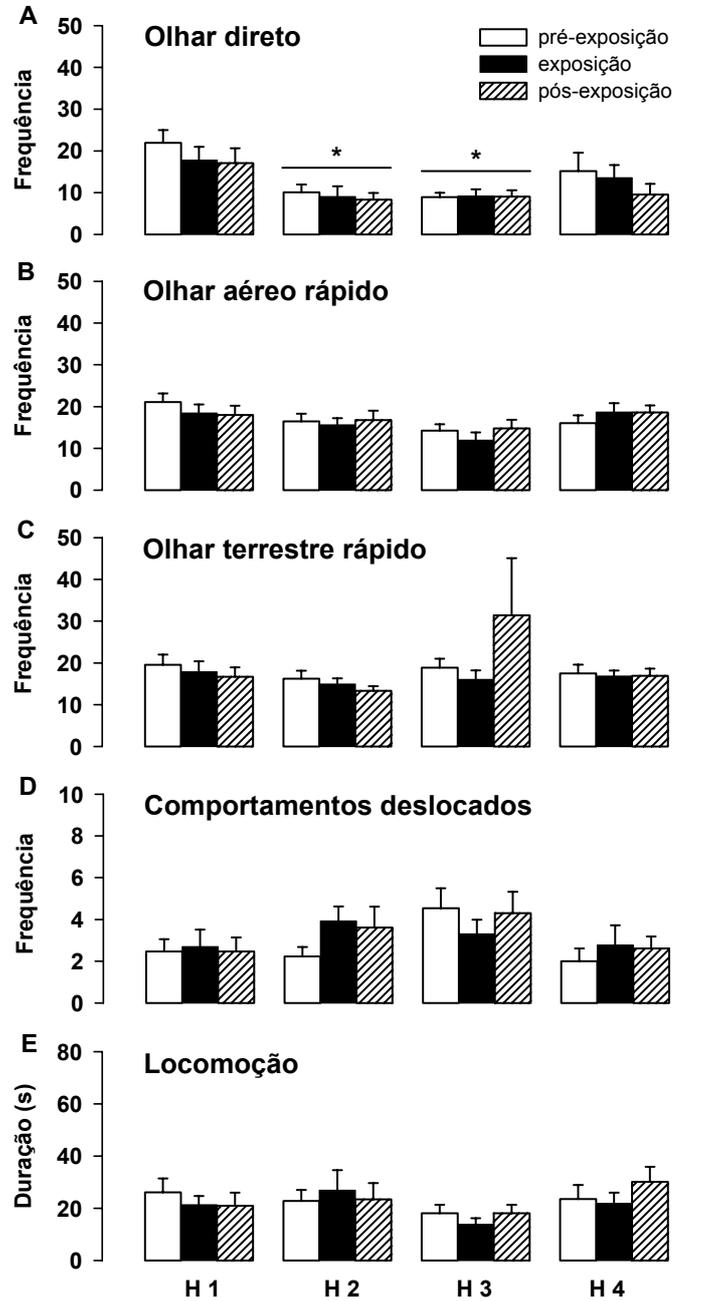
## 5. RESULTADOS

Os dados de cada parâmetro comportamental analisado foram agrupados, uma vez que não foram detectadas diferenças entre machos e fêmeas. Para cada comportamento, os resultados estão expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+e.p.m.).

### 5.1. EXPERIMENTO 1

#### 5.1.1. FASE 1 - HABITUAÇÃO

Durante a fase de habituação (H1–H4), conduzida na ausência dos estímulos aversivos e de qualquer tratamento farmacológico, o único parâmetro comportamental significativamente alterado entre as quatro sessões foi o de olhar direto [ $F(3,12)=3,90$ ;  $p<0,05$ ; Fig. 10A]. Análises *post hoc* indicaram que a frequência de olhar diretamente aos dois observadores sentados a sua frente diminuiu significativamente [ $p<0,05$ ] nas sessões H2 e H3, com relação a H1. Contudo, para este mesmo comportamento, diferenças significativas dentre cada sessão [ $F(2,12)=2,74$ ;  $p=0,08$ ] e uma interação sessão-intervalo experimental não foram observadas [ $F(6,72)=1,10$ ;  $p=0,37$ ]. Os demais comportamentos analisados permaneceram inalterados [*olhar aéreo rápido*: entre sessões –  $F(3,12)=2,31$ ;  $p=0,09$ ; entre intervalos –  $F(2,12)=0,32$ ;  $p=0,73$ ; interação –  $F(6,72)=1,20$ ;  $p=0,32$ ; *olhar terrestre rápido*: entre sessões –  $F(3,12)=0,71$ ;  $p=0,56$ ; entre intervalos –  $F(2,12)=0,56$ ;  $p=0,58$ ; interação –  $F(6,72)=1,27$ ;  $p=0,28$ ; *comportamentos deslocados*: entre sessões –  $F(3,12)=2,78$ ;  $p=0,06$ ; entre intervalos –  $F(2,12)=0,35$ ;  $p=0,71$ ; interação –  $F(6,72)=1,13$ ;  $p=0,36$ ; *locomoção*: entre sessões –  $F(3,12)=9,20$ ;  $p=0,44$ ; entre intervalos –  $F(2,12)=0,59$ ;  $p=0,56$ ; interação –  $F(6,72)=1,35$ ;  $p=0,25$ ; *monitoramento* – vide Anexo 3; Fig. 10B-E].



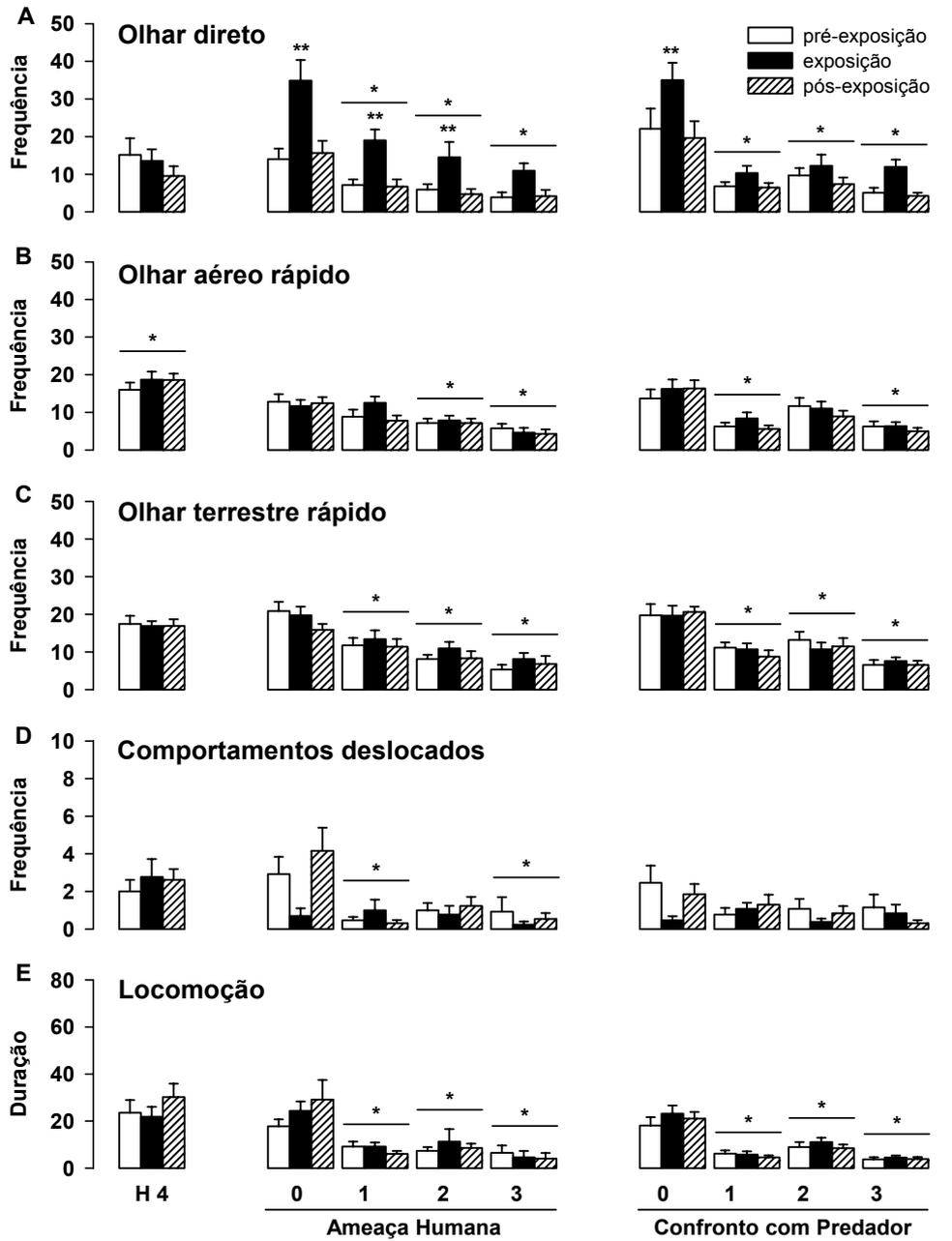
**Figura 10:** Frequência média (+e.p.m.) de olhar direto (A), olhar aéreo rápido (B), olhar terrestre rápido (C) e comportamentos deslocados (D), e a duração média (+e.p.m.) em segundos de locomoção (E) durante as quatro sessões de habituação (H1–H4) divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). \*p<0,05 vs. H1.

### 5.1.2. FASE 2 - CONFRONTO

O perfil comportamental observado durante as quatro sessões de confronto do teste de AH e do de CP, quando também foi administrado o tratamento farmacológico com DZP, foi representado graficamente junto com a última sessão de habituação da fase anterior (H4) para facilitar a comparação dos dados (Fig. 11).

A presença de ambos os estímulos aversivos, correspondente ao intervalo de EXP da sessão DZP0, induziu uma alteração significativa apenas no comportamento de olhar direto [*teste de AH*:  $F(2,12)=37,51$ ;  $p<0,001$ ; *teste de CP*:  $F(2,12)=14,13$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11A]. Para ambos os testes, análises posteriores indicaram que a frequência de olhar diretamente ao experimentador ou gato taxidermizado aumentou significativamente [ $p<0,05$ ] durante a EXP, comparado aos intervalos de PRE e POS. A presença dos dois estímulos (DZP0-intervalo EXP) também gerou uma diminuição na frequência dos comportamentos deslocados, apesar de não atingir níveis significativos [*teste de AH*:  $F(2,12)=3,04$ ;  $p=0,07$ ; *teste de CP*:  $F(2,12)=1,68$ ;  $p=0,21$ ; Fig. 11D]. Para os demais comportamentos analisados, não foram observadas diferenças significativas entre os três intervalos experimentais [*olhar aéreo rápido AH*:  $F(2,12)=0,84$ ;  $p=0,44$ ; *olhar aéreo rápido CP*:  $F(2,12)=0,99$ ;  $p=0,39$ ; *olhar terrestre rápido AH*:  $F(2,12)=1,78$ ;  $p=0,19$ ; *olhar terrestre rápido CP*:  $F(2,12)=0,23$ ;  $p=0,79$ ; *locomoção AH*:  $F(2,12)=1,14$ ;  $p=0,39$ ; *locomoção CP*:  $F(2,12)=0,61$ ;  $p=0,55$ ; *monitoramento*: vide Anexo 3; Fig. 11B-E].

A administração de DZP, por sua vez, diminuiu significativamente o perfil de olhar direto [*teste de AH*:  $F(4,12)=5,70$ ;  $p<0,001$ ; *teste de CP*:  $F(4,12)=10,13$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11A], olhar terrestre rápido [*teste de AH*:  $F(4,12)=11,77$ ;  $p<0,001$ ; *teste de CP*:  $F(4,12)=13,06$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11C] e locomoção [*teste de AH*:  $F(4,12)=8,47$ ;  $p<0,001$ ; *teste de CP*:  $F(4,12)=14,77$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11E] dos micos nas três doses testadas (DZP1-3).



**Figura 11:** Frequência média (+e.p.m.) de olhar direto (A), olhar aéreo rápido (B), olhar terrestre rápido (C) e comportamentos deslocados (D), e a duração média (+e.p.m.) em segundos de locomoção (E) durante a última sessão de habituação (H4) e as quatro sessões de confronto de cada um dos dois testes de medo/ansiedade, divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0, 1, 2 e 3 mg/kg. \* $p < 0,05$  vs. controle salina (DZP0) do respectivo teste; \*\* $p < 0,05$  vs. intervalo de pré- e pós-exposição da respectiva sessão.

No teste de AH a frequência de olhar aéreo rápido diminuiu significativamente nas doses de 2 e 3 mg/kg de DZP, comparado ao controle salina [ $F(4,12)=18,13$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11B], enquanto que na dos comportamentos deslocados houve uma diminuição significativa com as doses de 1 e 3 mg/kg de DZP, em relação ao controle salina [ $F(4,12)=4,85$ ;  $p<0,01$ ; Fig. 11D]. Já para o teste de CP, a administração de 1 e 3 mg/kg de DZP reduziu os níveis de olhar aéreo rápido, em relação ao controle salina [ $F(4,12)=11,20$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 11B], mas os comportamentos deslocados permaneceram inalterados [ $F(4,12)=3,14$ ;  $p=0,08$ ; Fig. 11D]. Da mesma forma, os comportamentos de monitoramento também permaneceram inalterados, nos dois testes, após a administração das três doses de DZP (vide Anexo 3).

Em termos de uma interação sessão-intervalo experimental, foram observados valores significativos apenas para os comportamentos deslocados [*teste de AH*:  $F(6,72)=2,59$ ;  $p<0,05$ ] e o olhar direto [*teste de AH*:  $F(6,72)=3,89$ ;  $p<0,001$ ; *teste de CP*:  $F(6,72)=2,03$ ;  $p<0,05$ ].

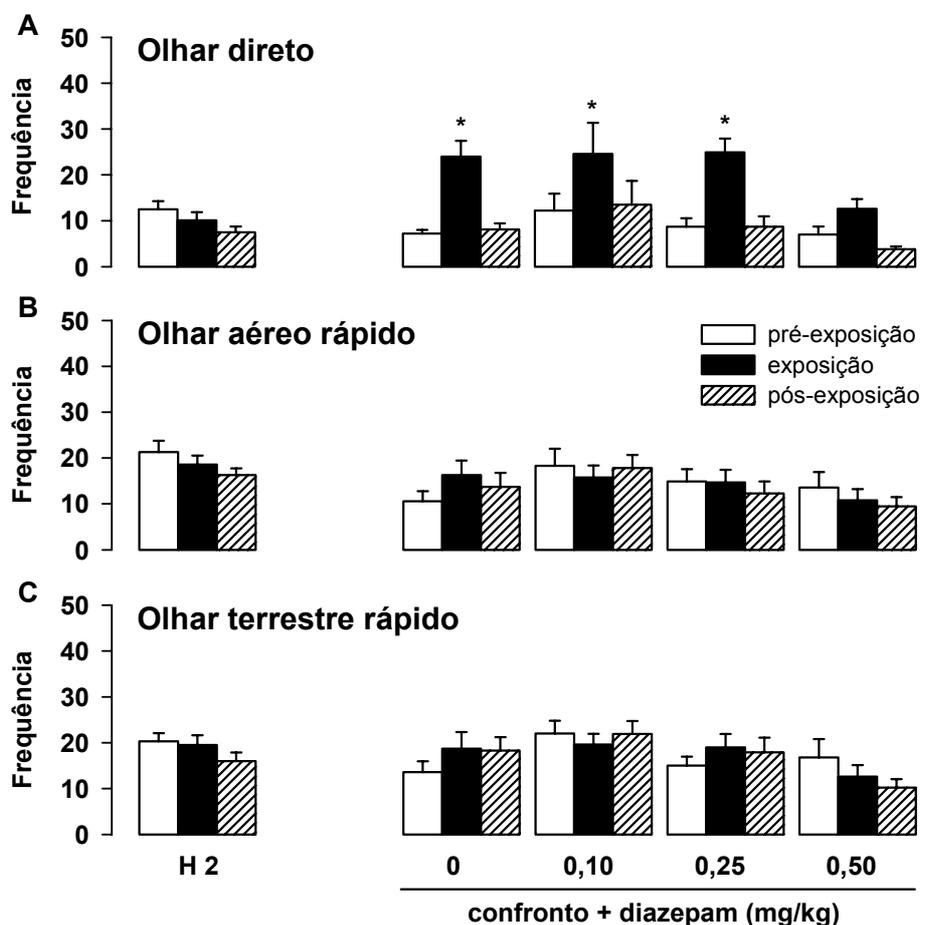
## 5.2. EXPERIMENTO 2

O perfil comportamental observado durante as quatro sessões de confronto do teste de AH (Figs. 12-13) e do teste de CP (Figs. 14-15) – quando também foi administrado o tratamento farmacológico com DZP – foi representado graficamente junto com a última sessão de habituação (H2) do seu respectivo teste, para facilitar a comparação dos dados. As sessões de habituação deste experimento foram realizadas antes de iniciar a fase do confronto (vide seção 4.2.).

### 5.2.1. TESTE DE AMEAÇA HUMANA

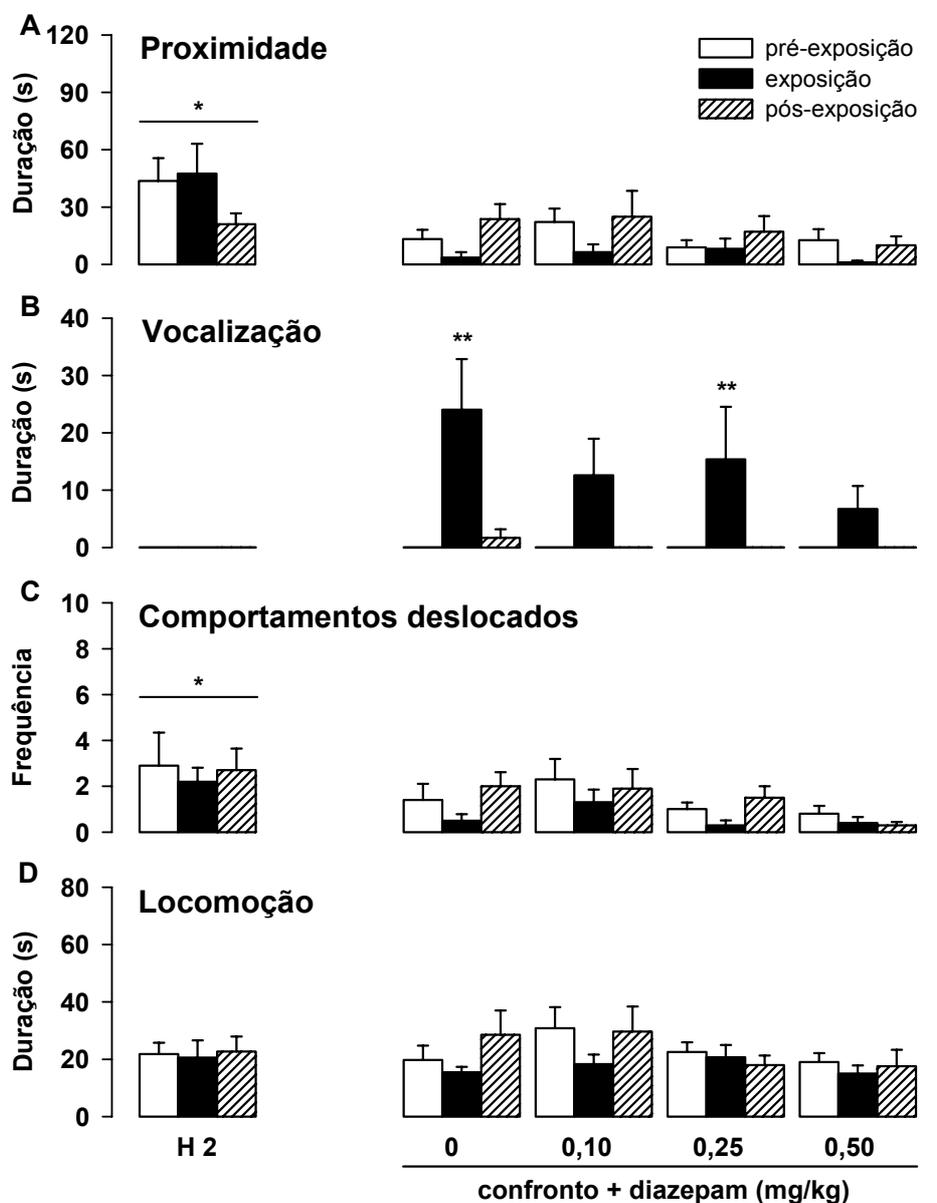
A presença do experimentador (DZP0–intervalo EXP), induziu uma alteração significativa nos níveis de olhares direcionados ao estímulo [ $F(2,9)=37,13$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 12A], de vocalização de alarme *tsik-tsik* [ $F(2,9)=8,72$ ;  $p<0,01$ ; Fig. 13B] e de monitoramento aéreo [*duração*:  $F(2,9)=12,07$ ;  $p<0,001$ ; Anexo 3-Tabela C]. Análises *post hoc* indicaram que a frequência de olhares diretos e a duração deste tipo de vocalização aumentou significativamente [ $p<0,05$ ] durante a EXP, comparado aos intervalos de PRE e POS. Já o tempo de monitoramento aéreo diminuiu de forma significativa na EXP, em relação aos intervalos PRE e POS. Os demais comportamentos dos micos que foram analisados neste teste não alteraram significativamente em resposta a presença do experimentador [*olhar aéreo rápido*:  $F(2,9)=1,15$ ;  $p=0,34$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(2,9)=0,18$ ;  $p=0,84$ ; *proximidade*:  $F(2,9)=1,58$ ;  $p=0,23$ ; *comportamentos deslocados*:  $F(2,9)=2,00$ ;  $p=0,17$ ; *locomoção*:  $F(2,9)=2,22$ ;  $p=0,14$ ; *monitoramento* – vide Anexo 3; Figs. 12 e 13].

Porém, as três doses de DZP administradas não foram capazes de reverter as alterações comportamentais induzidas pela presença do experimentador [*olhar direto*:  $F(4,9)=2,04$ ;  $p=0,11$ ; *vocalização*:  $F(4,9)=2,07$ ;  $p=0,11$ ; *duração monitoramento aéreo*:  $F(4,9)=1,25$ ;  $p=0,31$ ] e os demais comportamentos permaneceram inalterados [*olhar aéreo rápido*:  $F(4,9)=1,34$ ;  $p=0,27$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(4,9)=1,64$ ;  $p=0,18$ ; *locomoção*:  $F(4,9)=0,91$ ;  $p=0,46$ ; *monitoramento* – vide Anexo 3; Figs. 12 e 13]. Contudo, para o tempo despendido na tela frontal do viveiro [*proximidade*:  $F(4,9)=5,32$ ;  $p<0,05$ ; Fig. 13A] e a frequência dos comportamentos deslocados [ $F(4,9)=3,34$ ;  $p<0,05$ ; Fig. 13C], os níveis observados na última sessão de habituação (H2) foram significativamente maiores que no controle salina (DZP0).



**Figura 12:** Frequência média (+e.p.m.) de olhar direto (A), olhar aéreo rápido (B), olhar terrestre rápido (C) durante a última sessão de habituação (H2) e as quatro sessões de confronto com experimentador, divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg. \* $p < 0,05$  vs. intervalo de pré- e pós-exposição da respectiva sessão.

Em termos da interação sessão-intervalo experimental, foram observados valores significativos apenas para a proximidade [ $F(8,72)=2,21$ ;  $p < 0,05$ ] e o olhar direto [ $F(8,72)=4,66$ ;  $p < 0,001$ ].

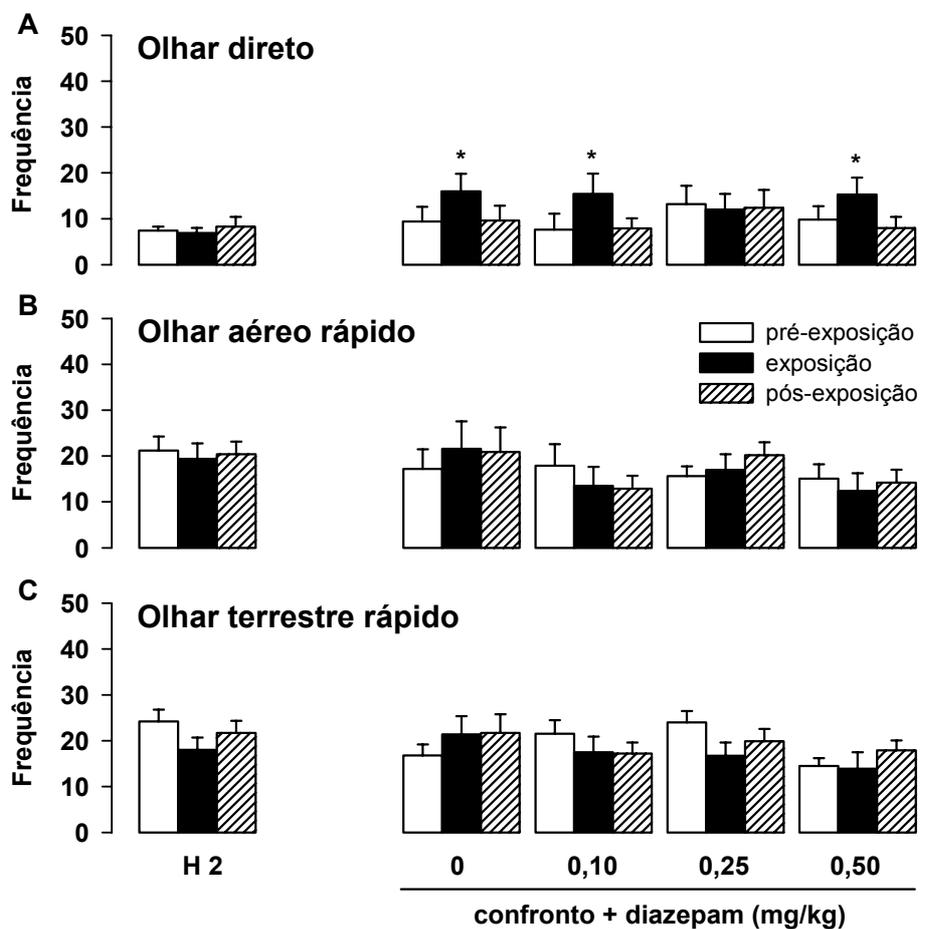


**Figura 13:** Frequência, ou tempo médio (+e.p.m.) gasto em segundos, em proximidade ao estímulo (A), emitindo vocalização *tsik-tsik* (B), de comportamentos deslocados (C) e em locomoção (D) durante a última sessão de habituação (H2) e as quatro sessões de confronto com experimentador, divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg. \* $p < 0,05$  vs. controle salina (DZP0); \*\* $p < 0,05$  vs. intervalo de pré- e pós-exposição da respectiva sessão.

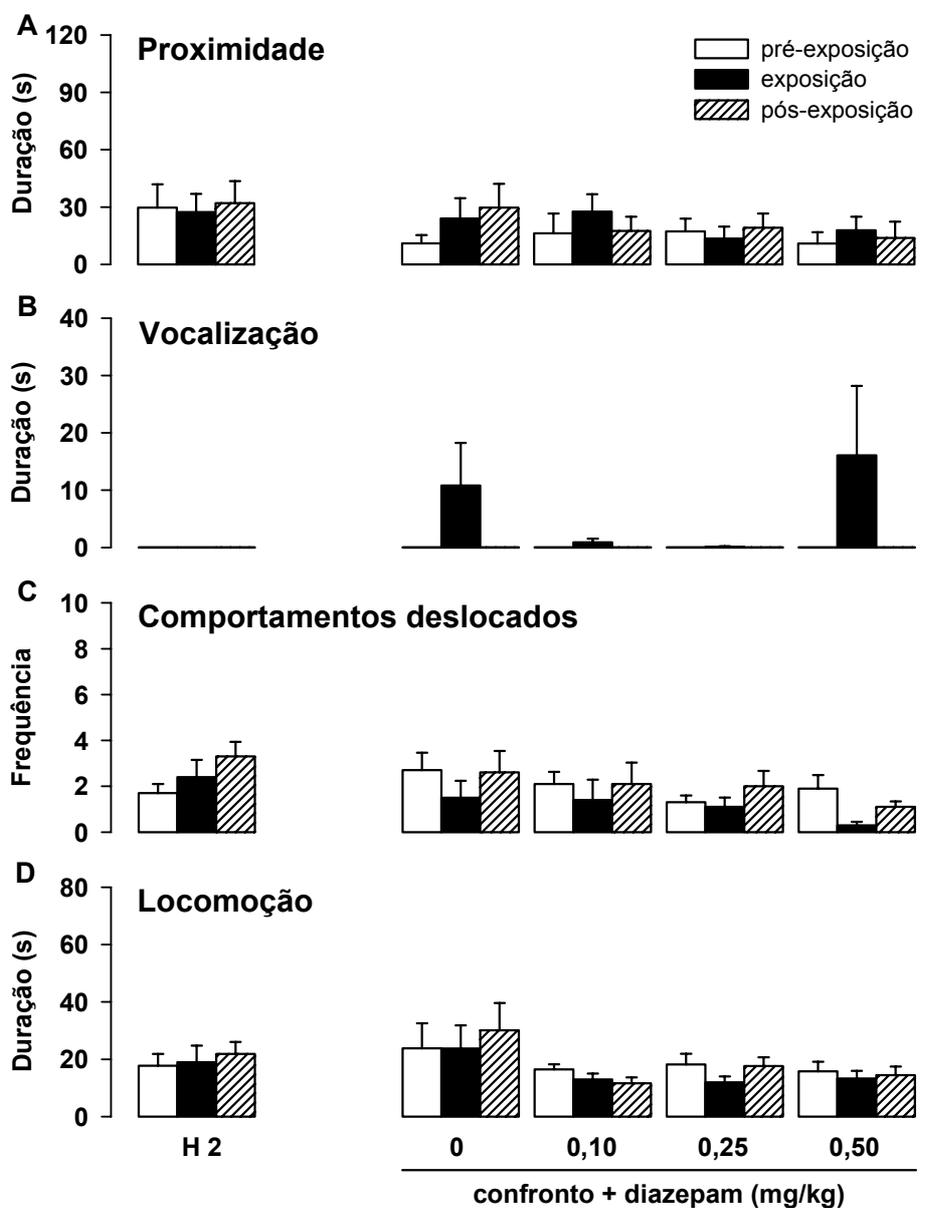
## 5.2.2. TESTE DE CONFRONTO COM PREDADOR

O confronto rápido com um predador natural (DZP0–intervalo EXP) alterou, de forma significativa, apenas a frequência com que os micos olharam diretamente ao gato taxidermizado [ $F(2,9)=9,45$ ;  $p<0,01$ ; Fig. 14A]. Análises posteriores indicaram que este comportamento de olhar direto aumentou significativamente [ $p<0,05$ ] durante a EXP, em relação aos intervalos PRE e POS. Apesar dos níveis da vocalização de alarme *tsik-tsik* também estarem elevados durante o confronto, valores significativos não foram observados [ $F(2,9)=2,46$ ;  $p=0,11$ ; Fig. 15B]. Os demais comportamentos analisados neste teste permaneceram inalterados [*olhar aéreo rápido*:  $F(2,9)=0,39$ ;  $p=0,68$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(2,9)=3,24$ ;  $p=0,06$ ; *proximidade*:  $F(2,9)=0,45$ ;  $p=0,65$ ; *comportamentos deslocados*:  $F(2,36)=2,73$ ;  $p=0,09$ ; *locomoção*:  $F(2,36)=3,32$ ;  $p=0,06$ ; *monitoramento* – vide Anexo 3; Figs. 14 e 15].

Neste teste, nenhuma das doses de DZP administradas foi capaz de reverter a alteração no comportamento de olhar direto, induzido pela presença do gato taxidermizado [*olhar direto*:  $F(4,9)=0,45$ ;  $p=0,77$ ], e os demais comportamentos permaneceram inalterados [*olhar aéreo rápido*:  $F(4,9)=0,66$ ;  $p=0,62$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(4,9)=0,80$ ;  $p=0,54$ ; *proximidade*:  $F(4,9)=1,35$ ;  $p=0,27$ ; *vocalização*:  $F(4,9)=1,58$ ;  $p=0,20$ ; *comportamentos deslocados*:  $F(4,9)=2,33$ ;  $p=0,08$ ; *locomoção*:  $F(4,9)=1,54$ ;  $p=0,21$ ; Fig. 14 e 15]. Além disso, uma interação sessão-intervalo experimental significativa foi observada apenas para o comportamento de olhar direto [ $F(8,72)=2,83$ ;  $p<0,01$ ].



**Figura 14:** Frequência média (+e.p.m.) de olhar direto (A), olhar aéreo rápido (B), olhar terrestre rápido (C) durante a última sessão de habituação (H2) e as quatro sessões de confronto com gato taxidermizado, divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg. \* $p < 0,05$  vs. controle salina (DZP0).



**Figura 15.** Frequência, ou tempo médio (+e.p.m.) gasto em segundos, em proximidade ao estímulo (A), emitindo vocalização *tsik-tsik* (B), de comportamentos deslocados (C) e em locomoção (D) durante a última sessão de habituação (H2) e as quatro sessões de confronto com o gato taxidermizado, divididas nos três intervalos experimentais (pré-exposição em branco, exposição em preto, pós-exposição em hachurado). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg.

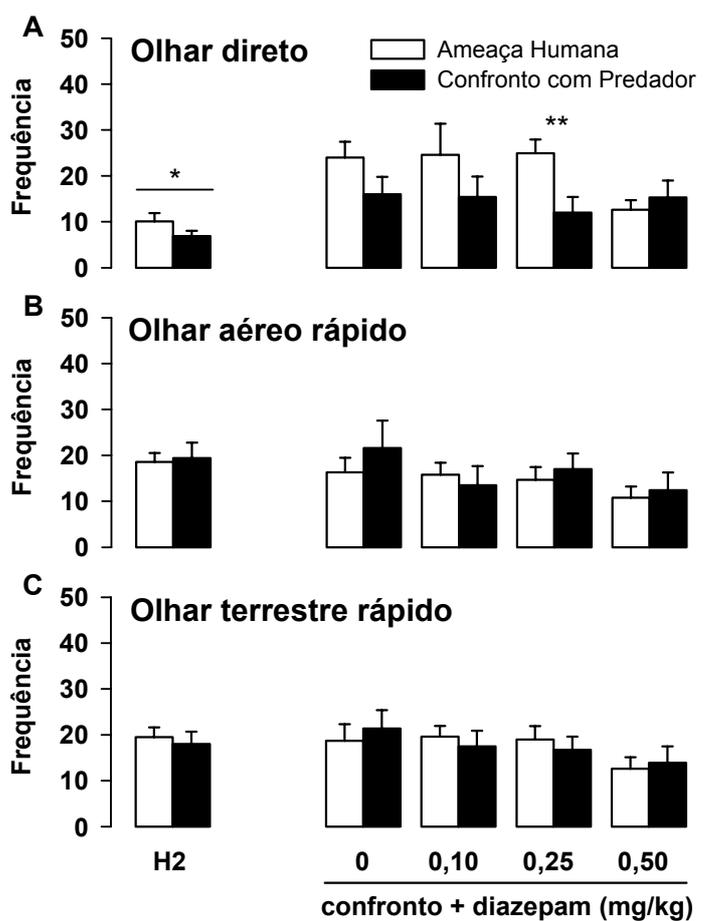
### 5.2.3. TESTE DE AMEAÇA HUMANA *versus* CONFRONTO COM PREDADOR

Com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os dois estímulos aversivos utilizados, as respostas comportamentais observadas apenas durante o confronto de um dos testes (intervalo EXP) foram comparadas as mesmas mensuradas do outro teste (Figs. 16 e 17).

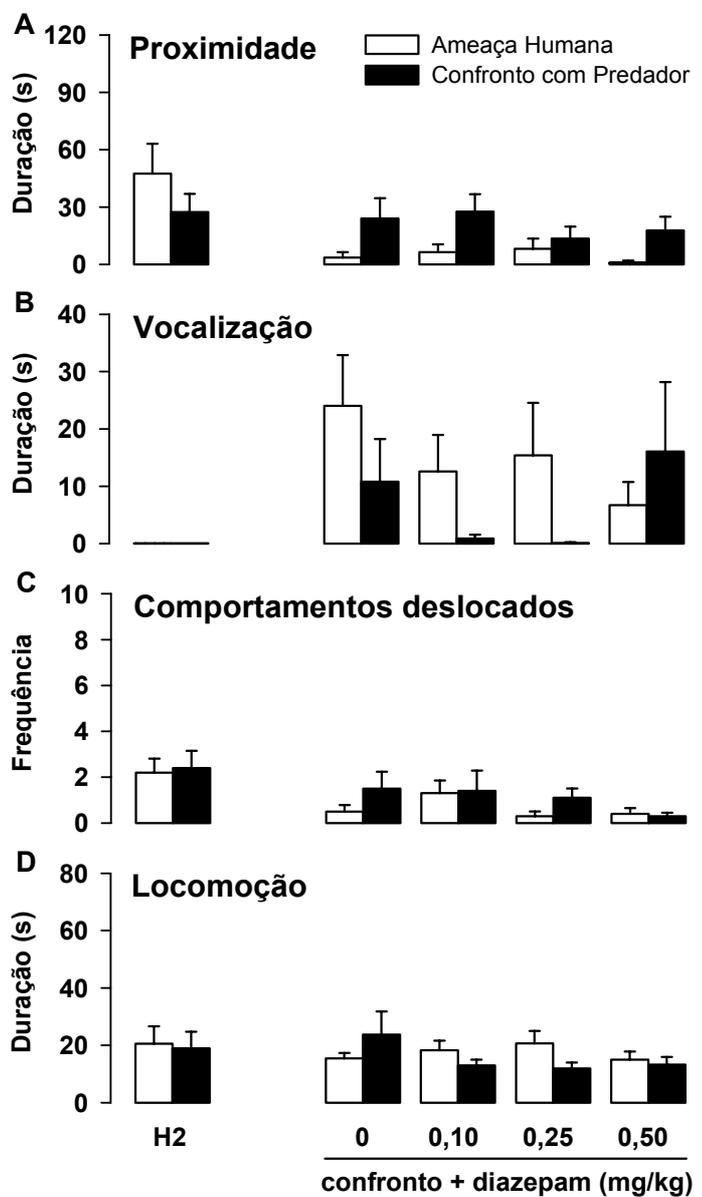
A presença do experimentador humano e do gato taxidermizado (DZP0) induziu uma alteração significativa no comportamento de olhar direto [ $F(4,9)=4,02$ ;  $p<0,01$ ; Fig. 16A] e de proximidade [ $F(4,9)=2,59$ ;  $p=0,05$ ], como visto anteriormente (vide seções 5.2.1 e 5.2.2). Análises posteriores indicaram que as freqüências de olhares direcionados aos estímulos aumentaram enquanto que o tempo de permanência em proximidade ao estímulo aversivo diminuiu significativamente [ $p<0,05$ ], comparados à suas respectivas sessões H2. A presença de ambos os estímulos também induziram uma diminuição na freqüência dos comportamentos deslocados [ $F(4,9)=3,50$ ;  $p=0,02$ ; Fig. 17C] e um aumento na vocalização *tsik-tsik* [ $F(4,9)=2,90$ ;  $p=0,08$ ; Fig. 17B], apesar de não atingirem níveis significativos. Os demais comportamentos analisados permaneceram inalterados [*olhar aéreo rápido*:  $F(4,9)=2,17$ ;  $p=0,09$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(4,9)=1,52$ ;  $p=0,22$ ; *locomoção*:  $F(4,9)=0,54$ ;  $p=0,71$ ; Figs. 16 e 17].

Comparados entre si, os dois tipos de estímulos testados resultaram em uma resposta significativamente diferente para o comportamento de olhar direto [ $F(1,36)=5,66$ ;  $p<0,05$ ; Fig. 16A]. Análises *post hoc* indicaram que a freqüência desta resposta foi significativamente [ $p<0,05$ ] maior no teste de AH que no de CP, mas apenas para a sessão DZP0,25. Para os demais parâmetros comportamentais analisados, não houve diferença significativa entre as respostas observadas na presença dos dois estímulos [*olhar aéreo rápido*:  $F(1,36)=0,52$ ;  $p=0,49$ ; *olhar terrestre rápido*:  $F(1,36)=0,05$ ;  $p=0,82$ ; *proximidade*:

$F(1,36)=2,50$ ;  $p=0,15$ ; vocalização *tsik-tsik*:  $F(1,36)=1,01$ ;  $p=0,34$ ; comportamentos deslocados:  $F(1,36)=1,13$ ;  $p=0,32$ ; Figs. 16 e 17].



**Figura 16.** Frequência média (+e.p.m.) de olhar direto (A), olhar aéreo rápido (B) e olhar terrestre rápido (C) durante os 5 min do intervalo de exposição da última sessão de habituação (H2) e das quatro sessões de confronto correspondente ao teste de Ameaça Humana (em branco) e de Confronto com Predador (em preto). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg. \* $p<0,05$  vs. controle salina (DZP0), \*\* $p<0,05$  vs. teste de Ameaça Humana da respectiva sessão.



**Figura 17.** Frequência, ou tempo médio (+e.p.m.) gasto em segundos, em proximidade ao estímulo (A), emitindo vocalização *tsik-tsik* (B), de comportamentos deslocados (C) e em locomoção (D) durante a última sessão de habituação (H2) e das quatro sessões de confronto correspondente ao teste de Ameaça Humana (em branco) e de Confronto com Predador (em preto). Nas sessões de confronto, foi administrado diazepam nas doses de 0; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg.

## 6. DISCUSSÃO

Vários são os estímulos naturalmente aversivos capazes de induzir respostas de estresse, medo e ansiedade em animais, a exemplo de co-específicos e predadores naturais. Esses estímulos não somente induzem reações mais próximas às que foram selecionadas na natureza, como geram um maior número de parâmetros comportamentais (Blanchard e cols., 1998). Neste contexto, o repertório comportamental resultante de um confronto com estes estímulos vem sendo cada vez mais empregado para investigar os mecanismos neurais envolvidos nos distúrbios de ansiedade, assim como no desenvolvimento de novos compostos com uma possível atividade ansiolítica na prática clínica.

Dentre os estudos desta natureza, vem crescendo o uso de primatas não-humanos como modelos experimentais. Símios constituem modelos ímpares para o estudo do medo e da ansiedade devido a sua proximidade filogenética a humanos e a semelhança comportamental e fisiológica exibida quando estas emoções são induzidas experimentalmente, como também à complexidade e semelhança do seu SNC com a do homem. De fato, várias espécies de primatas não-humanos têm sido utilizadas como último passo em ensaios pré-clínicos para averiguar a segurança e eficácia de novos tratamentos farmacológicos antes destes compostos serem testados em humanos (ex. King e cols., 1988).

Em calitriquídeos, particularmente, têm-se explorado as reações de defesa observadas quando estes símios são confrontados com um potencial predador, a exemplo de um experimentador humano ou gato-do-mato taxidermizado. De fato, o risco de predação parece ter exercido uma influência significativa sobre vários aspectos do repertório comportamental desses pequenos primatas neotropicais (Sussman e Kinzey, 1984; Caine, 1993), tendo uma das maiores taxas estimadas de predação entre os primatas (Cheney e

Wrangham, 1987). Contudo, tal pressuposto está mais fundamentado na diversidade e complexidade de suas estratégias anti-predatórias, do que no número de predações propriamente dito, uma vez que tais eventos são pouco observados na natureza (Searcy e Caine, 2003).

Dentre suas diversas estratégias contra a predação, os calitriquídeos escolhem cuidadosamente seus sítios de descanso, recolhem-se antes do pôr-do-sol, distanciam-se rapidamente do sítio de descanso após acordarem, dormem amontoados em grupos, têm membros do grupo que atuam como sentinelas, formam grupos mistos com outras espécies de primatas e emitem vocalizações específicas (Caine, 1987; Dawson, 1979; Ferrari e Lopes Ferrari, 1990; Hardie e Buchanan-Smith, 1997; Heymann, 1990; Peres, 1993; Pook e Pook, 1982; Savage e cols., 1996). Relata-se ainda que os calitriquídeos mantenham altos níveis basais de monitoramento visual (Ferrari e Lopes Ferrari, 1990), um comportamento que persiste mesmo entre indivíduos cativos ou nascidos em cativeiro (Barros e cols., 2004; Buchanan-Smith, 1999; Caine, 1984).

Além disso, estes pequenos símios são vulneráveis a vários potenciais predadores – aves de rapina, cobras e felinos – respondendo diferentemente a ameaças aéreas e terrestres (Ferrari & Lopes Ferrari, 1990). Mesmo estímulos apenas relacionados à presença de um predador (ex. odor), ou ataques mal sucedidos, podem ter um efeito significativo e duradouro sobre o seu comportamento (Caine e Weldon, 1989; Hankerson e cols., 2001; Barros e cols., 2002, 2004). Em resposta a situações de ameaça (ex. confronto com predador, interações co-específicas), esses animais apresentam um repertório comportamental complexo e facilmente discernível, variando desde expressões faciais e vocalizações específicas, até alterações posturais (Barros e cols., 2002).

## **6.1. Efeitos comportamentais e do diazepam**

### **6.1.1. Experimento 1**

Os micos confrontados com um experimentador humano e gato taxidermizado, em conjunto com a administração das doses de 1, 2 e 3 mg/kg de DZP, apresentaram uma redução significativa no seu padrão de locomoção. De fato, a atividade locomotora dos sujeitos estava reduzida não somente durante o intervalo de EXP, como também nos de PRE e POS também, o que é sugestivo de um efeito sedativo da administração deste BZD. Sabe-se, na verdade, que o DZP pode gerar efeitos adversos marcantes como relaxamento muscular, ataxia e sedação (ex. Argyropoulos e cols., 2000). Interessante é o fato destas mesmas doses de DZP não terem causado um efeito sedativo em estudos anteriores no teste de CP (Barros e cols., 2000; 2004). Essa discrepância pode ser devida, em parte, a diferenças metodológicas, já que nos estudos anteriores os testes foram realizados em um labirinto-em-8. Este, um ambiente novo, pode já ser visto como algo aversivo para calitriquídeos (ex. Johnson e cols., 1996). Portanto, as demais alterações comportamentais observadas neste experimento podem ter sido influenciadas por este efeito sedativo das doses de DZP que foram testadas, inviabilizando uma correta interpretação desses resultados.

Vale destacar, porém, que o confronto com ambos os estímulos usados neste estudo induziram um aumento na frequência com que os micos olharam diretamente ao experimentador e o gato taxidermizado (apenas no intervalo EXP), que por sua vez foi revertido pela administração do DZP. Este perfil, sugestivo de um efeito ansiolítico deste composto, deve ser analisado com cautela, devido à sedação que também foi observada.

### 6.1.2. Experimento 2

Um novo experimento foi realizado então, utilizando doses mais baixas de DZP, para que os efeitos comportamentais e farmacológicos deste ansiolítico pudessem ser avaliados confiavelmente nos testes de AH e CP de medo/ansiedade nos micos. Para tanto, neste segundo experimento, foram administradas as doses de 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg, baseado em resultados obtidos com o teste de AH (Carey e cols., 1992).

Portanto, neste segundo experimento, as doses mais baixas de DZP que foram usadas não alteraram significativamente a atividade locomotora observada antes, durante ou após o confronto dos sujeitos com ambos os estímulos aversivos. Sendo assim, as demais alterações comportamentais observadas estão mais relacionadas à presença do experimentador humano ou gato taxidermizado, do que a um efeito sedativo induzido pela administração do DZP. A tabela 3 faz um resumo dos resultados observados no intervalo de exposição para cada parâmetro comportamental avaliado nos dois testes de medo/ansiedade.

Neste sentido, a presença de ambos os estímulos aversivos induziu um aumento significativo na frequência de olhares direcionados a estes estímulos. De forma semelhante, Hayes e Snowdon (1990) também observaram um aumento na frequência de olhares direcionados a estímulos aversivos (ex. jibóia – *Constrictor constrictor*), comparado aos que foram direcionadas a estímulos neutros (ex. flores). Além disso, no presente estudo, apenas a administração da maior dose (0,5 mg/kg) de DZP, no teste de AH, reverteu esse aumento. Neste contexto, e considerando os resultados obtidos no Experimento 1, uma alteração nos níveis desta resposta parece estar relacionada ao reconhecimento de um estímulo e seu

potencial ameaçador, podendo vir a ser empregado como um indicador comportamental de medo/ansiedade em micos.

**Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos no intervalo de exposição para cada parâmetro comportamental observado nos dois teste de medo/ansiedade dos Experimentos 1 e 2\*.

Comportamento	Experimento 1 <sup>a</sup>				Experimento 2 <sup>b</sup>			
	Ameaça Humana		Confronto com Predador		Ameaça Humana		Confronto com Predador	
	VEH	DZP	VEH	DZP	VEH	DZP	VEH	DZP
Olhar direto	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	○
Olhar aéreo rápido	↓	↓	○	↓	○	○	○	○
Olhar terrestre rápido	○	↓	○	↓	○	○	○	○
Proximidade	--	--	--	--	↓	○	○	○
Vocalização	--	--	--	--	↑	↓	○	○
Deslocados	↓	↓	↓	○	○	○	○	○
Locomoção	○	↓	○	↓	○	○	○	○
Monitoramento:								
aéreo (frequência)	○	○	○	○	○	○	○	○
aéreo (duração)	○	○	○	○	↓	↓	○	○
terrestre (frequência)	○	○	○	○	○	○	○	○
terrestre (duração)	○	○	○	○	○	○	○	○

\* (↑)=aumentou; (↓)=diminuiu; (○)=não alterou; (--)=não avaliado

<sup>a</sup> diazepam administrado nas doses de 1; 2 e 3 mg/kg (i.p.)

<sup>b</sup> diazepam administrado nas doses de 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg (i.p.)

Outro parâmetro comportamental avaliado neste estudo foi o de proximidade ao estímulo, medido pelo tempo de permanência em contato com a tela frontal do viveiro de moradia do sujeito. Uma resposta de 'evitação ao estímulo' já foi observada em vários animais confrontados com diferentes predadores (ex. Hayes e Snowdon, 1990). Em micos, mais especificamente, uma diminuição na proximidade também já foi detectada quanto estes símios foram confrontados com um experimentador humano (ex. Carey e cols., 1992) e um

gato taxidermizado (ex. Barros e cols., 2004), sendo considerado um importante indicador comportamental de medo/ansiedade nestes primatas. Contudo, no presente estudo, uma diminuição na proximidade ao estímulo foi observada apenas em resposta a presença do experimentador humano (teste de AH). Este comportamento de evitação, por sua vez, não foi revertido pela administração das baixas doses de DZP (0,10; 0,25; 0,50 mg/kg), apesar de Carey e cols. (1992) terem observado um efeito ansiolítico significativo no parâmetro de proximidade usando as mesmas doses deste benzodiazepínico.

No teste de CP, a presença do gato taxidermizado – com ou sem a administração de DZP – não induziu um perfil de evitação nos micos testados, ao contrário do que já foi relatado para este teste (Barros e cols., 2000). Esta discrepância pode ser devido a diferenças metodológicas entre os dois estudos, como o uso de animais ingênuos vs. experientes. Neste segundo experimento do presente trabalho, foram empregados apenas sujeitos experientes, sugerindo que uma possível habituação à presença do gato taxidermizado pode ter diminuído o comportamento de evitação dos micos a presença do gato taxidermizado. Contudo, estes primatas ainda evitam uma proximidade ao mesmo gato taxidermizado, e apresentam um efeito ansiolítico do DZP sobre esta resposta, mesmo depois de três meses de um confronto inicial (Barros e cols., 2007). Portanto, outros fatores metodológicos, como ambiente físico (labirinto vs. viveiro de moradia) e social (confronto individual vs. pares) podem estar contribuindo de forma mais significativa para as diferenças observadas entre o presente estudo e outros trabalhos já realizados com este teste de medo/ansiedade (vide discussão mais detalhada no item 6.2.)

Em termos da vocalização *tsik-tsik*, foi detectado um aumento no seu tempo de emissão por parte dos micos durante a exposição aos estímulos aversivos. Contudo, o aumento nos níveis desta vocalização foi de forma significativa apenas na presença do experimentador humano (teste de AH), tendo sido revertido pela administração de DZP nas

doses de 0,10 e 0,50 mg/kg. Visto como uma vocalização de alarme e componente importante do repertório comportamental de defesa dos calitriquídeos (Stevenson e Rylands, 1988), o *tsik-tsik* está normalmente associado à aproximação de predadores terrestres (Ferrari e Lopes Ferrari, 1990). De fato, Hayes e Snowdon (1990) também observaram um aumento na duração de vocalizações de alarme em sagüis confrontados com estímulos aversivos (ex. jibóia) *versus* estímulos neutros (ex. flores), corroborando a noção de que esses animais reconhecem estímulos potencialmente ameaçadores e exibem vocalizações específicas diante destas ameaças. Na presença de um experimentador humano, vocalizações de alarme ainda não foram avaliadas em micos, mas em macacos rhesus, um aumento nas suas taxas foi relatado por Newman e Farley (1995) empregando o teste de AH.

No teste de CP em micos, um aumento nesse parâmetro já foi observado durante um confronto com o mesmo predador (Barros e cols., 2004). A falta de um aumento significativo na vocalização *tsik-tsik* no presente estudo pode ter ocorrido devido a: 1) uma habituação dos sujeitos em relação ao estímulo utilizado, uma vez que todos eram experientes (Barros e cols., 2004); e 2) uma grande variabilidade inter-individual dos sujeitos e o reduzido número de sujeitos testados. Outros aspectos metodológicos também podem ter influenciado, sendo estes discutidos no item 6.2. abaixo.

Adicionalmente foram observados os comportamentos de coçar, fazer marcação-de-cheiro e catar, agrupados como comportamentos deslocados. Sua frequência diminuiu significativamente quando os micos foram submetidos ao teste de AH, não sendo revertida pela administração das doses baixas de DZP testadas neste experimento. No teste de CP, a taxa de comportamentos deslocados dos micos não foi alterada, podendo novamente o uso apenas de animais experientes ter influenciado o perfil observado. Além disso, a

administração de DZP não alterou a frequência observada deste parâmetro comportamental no teste de CP.

Estudos anteriores, porém, vêm indicando que um aumento nestas repostas podem indicar um estado de medo e ansiedade em calitriquídeos, quando em uma situação de incerteza, conflito, tensão ou estresse (Cilia e Piper, 1997). Apesar de não ter sido ainda avaliado no teste de AH, este indicador de medo/ansiedade já foi observado durante confrontos com co-específicos (ex. Epple e cols., 1993) e predadores (ex. Barros e cols., 2002), sendo reduzidas pela administração de ansiolíticos, como DZP e buspirona, em testes de medo/ansiedade de confronto com co-específico (Cilia e Piper, 1997). O fato dos estímulos aversivos usados no presente estudo ter diminuído os níveis de comportamentos deslocados sugere que os sujeitos podem estar habituados à presença do estímulo, visto que nesse experimento os sujeitos utilizados eram todos experientes. Além disso, sabe-se que alguns comportamentos habitam mais rapidamente que outros (Barros e cols, 2004), indicando também que esse comportamento pode ter sido rapidamente influenciado.

O último parâmetro comportamental associado ao medo/ansiedade, também avaliado nos dois testes, foi o de vigilância. Na verdade, esta resposta vem sendo empregada como importante indicador comportamental de medo/ansiedade em roedores, mas em primatas ainda é pouco estudada. Em micos, sabe-se que as taxas de vigilância aumentam em resposta a uma ameaça (Caine, 1987; Koenig, 1998), possivelmente facilitando a sua detecção, sendo mensurada como o comportamento de monitoramento do ambiente (Caine, 1984), e mais recentemente também pelo olhar rápido (Koenig, 1998). De fato, o contato com um predador, ou com qualquer ameaça incerta, aumentam as taxas de vigilância (Caine, 1986; Barros e cols., 2004), possivelmente havendo uma diferença quantitativa e qualitativa entre o padrão de monitoramento aéreo e o terrestre (Barros e cols., 2004). Os micos parecem passar mais tempo monitorando seu ambiente (ex. Barros e cols., 2003),

corroborando o fato de serem mais susceptíveis a predadores aéreos (Caine, 1984), mas olham rapidamente para baixo com mais frequência.

No presente estudo a duração do monitoramento aéreo diminuiu, significativamente, durante o confronto com o experimentador humano, porém esta alteração comportamental não foi em geral revertida pela administração de DZP. O comportamento de olhar (aéreo e terrestre) rápido, por sua vez, não foi alterado pela exposição aos dois estímulos aversivos. No teste de CP, realizado num ambiente de labirinto, tem-se um relato de que apenas a presença do gato taxidermizado não alterou a vigilância dos micos, mas a administração de 2 mg/kg de DZP aumentou o monitoramento terrestre e diminuiu o olhar aéreo rápido (Barros e cols., 2007). Contudo, esses comportamentos ainda não foram avaliados no teste de AH.

Baseado apenas nestes poucos estudos a cerca dos comportamentos de vigilância em testes de medo/ansiedade em micos, estas respostas não parecem ser bons indicadores do estado emocional dos sujeitos submetidos a este tipo de procedimento. Portanto, novos estudos são necessários para se avaliar melhor os parâmetros experimentais que possivelmente influenciam este comportamento e se de fato não se enquadra como um indicador de medo/ansiedade em primatas não-humanos.

## **6.2. Aspectos metodológicos**

Tendo em vista as diferenças observadas entre os dados obtidos no presente estudo e os já descritos na literatura, torna-se relevante uma discussão a respeito de alguns aspectos metodológicos, a exemplo do tempo e frequência de exposição aos estímulos, assim como dos ambientes físico e social onde ocorrem os confrontos.

O tempo e a frequência de exposição a um estímulo aversivo pode ser considerado um fator metodológico importante, visto que os calitriquídeos possuem uma capacidade

cognitiva desenvolvida (Caine e Weldon, 1989; Buchanan-Smith e cols., 1993), podendo sua resposta comportamental habituar se confrontados várias vezes com a mesma situação. Em estudos anteriores, uma sequência de exposições longas (30 min) ao mesmo gato taxidermizado usado neste estudo induziu reações de medo/ansiedade em micos-estrela, porém, também gerou um efeito de habituação ao longo das sessões realizadas em um ambiente de labirinto (Barros e cols., 2004). Confrontos mais curtos e em ambientes familiares, por sua vez, podem reduzir esses efeitos de habituação ao estímulo, ao mesmo tempo em que se aproxima mais do que ocorre na natureza com esses animais. Em uma situação deste tipo (confrontos 1-3 min), e em um ambiente altamente familiar (ex. viveiro de moradia), os micos também demonstraram um perfil comportamental indicativo de medo/ansiedade (Hayes e Snowdon, 1990; Carey e cols., 1992; Rodgers e cols., 2000; Barros e cols., 2002), apesar de um efeito de habituação também ter sido observado por Dacier e cols. (2006) após três exposições. Em termos de confrontos com um experimentador humano, a duração de <5 min que é normalmente empregada gerou respostas de medo/ansiedade em micos (Carey e cols., 1992), apesar de não existirem estudos avaliando o impacto de exposições repetidas a este estímulo. Portanto, outros fatores também parecem contribuir, de forma significativa, para o padrão de respostas observadas nos testes de AH e CP, além da combinação entre a duração e frequência de exposições.

Neste contexto, também é importante considerar o local onde o teste é conduzido, principalmente pelo fato de ambientes novos poderem atuar, por si só, como uma fonte ansiogênica para calitriquídeos (Smith e cols, 1998; Dettling, 2002), e assim influenciar o perfil comportamental observado na presença de um experimentador ou predador natural. Em ambientes novos, esses animais demonstram altas taxas de vigilância, vocalizações de contato social (*long call*), comportamentos deslocados e atividade locomotora, assim como

níveis mais elevados de cortisol (Caine, 1998; Smith e cols., 1998; Norcross e Newman, 1999; Dettling, 2002; Barros e cols., 2004). Para animais selvagens, ambientes novos podem aumentar o risco de predação devido a uma separação dos outros membros do grupo ou a falta de rotas de fuga ou abrigos para proteção (Barros e cols., 2004).

No teste de AH, os animais vem sendo testados nos seus próprios viveiros, mas no de CP só foram testados estudos em um ambiente de labirinto. Sessões de habituação prévia a este aparato são geralmente realizadas, tendo-se uma diminuição na atividade locomotora dos sujeitos (ex. Barros e cols., 2000), mas não se sabe ainda se os animais estão realmente familiarizados a este ambiente antes de se iniciar os confrontos com o predador. Dessa forma, testes realizados no próprio viveiro de moradia dos sujeitos reduzem o possível efeito de novidade do ambiente, além de diminuir o tempo necessário para a realização do teste, visto que não há necessidade de uma habituação ao aparato.

Ademais, primatas são animais extremamente sociáveis, sendo o isolamento social também uma fonte de estresse considerável, induzindo respostas de medo/ansiedade. Inclusive, esta estratégia é aplicada como fonte indutora de ansiedade em testes experimentais em primatas (ex. Kalin e cols., 1987). Como os procedimentos experimentais do presente estudo foram conduzidos no próprio viveiro de moradia dos sujeitos, estes estavam em seu ambiente social familiar – aos pares, minimizando novamente possíveis efeitos gerados pelo isolamento social já observado anteriormente (Norcross e Newman, 1999).

Portanto, as diferenças em termos da duração de exposição (20-30 min vs. 5 min), e dos ambientes físico (labirinto vs. viveiro de moradia) e social (isolamento vs. aos pares), entre os testes anteriores usando o procedimento de confronto com um predador e o do presente trabalho, podem ter contribuído significativamente para as discrepâncias observadas. Dentre elas, destaca-se o efeito sedativo do DZP no Experimento 1 e a

ausência de resposta típicas de medo/ansiedade, como o comportamento de evitar uma proximidade com o predador. Estes aspectos metodológicos não parecem se aplicar ao teste de AH, que foi realizado em condições similares aos já descritos na literatura – confronto de 5 min no viveiro de moradia com os demais membros do grupo.

### **6.3. Validade dos testes de medo/ansiedade**

Testes experimentais de medo/ansiedade devem tentar satisfazer alguns critérios de validade, sendo eles – principalmente – o teórico, o fenomenológico, o preditivo e o concorrente (Treit, 1985; Zangrossi, 1997). Este último estabelece o grau de similaridade entre um teste com outros modelos previamente desenvolvidos e validados. A validade concorrente entre os testes de AH e CP em calitriquídeos ainda não foi propriamente estabelecida, devido em parte a importantes diferenças metodológicas. No presente trabalho, os testes foram realizados de forma semelhante, com o intuito de se avaliar este tipo de validade entre os dois procedimentos.

Neste sentido, não foram observadas diferenças significativas em cada uma das respostas comportamentais demonstradas pelos micos quando na presença do experimentador humano e do gato taxidermizado. Tal resultado sugere que, de uma forma geral, os dois estímulos apresentam um efeito similar sobre o comportamento dos micos. Contudo, ao analisar o conjunto das alterações observadas, o experimentador humano do teste de AH pareceu ser um pouco mais eficaz para induzir alterações comportamentais relacionadas ao medo/ansiedade, e estas por sua vez mais sensíveis aos efeitos da administração do DZP (Experimento 2). Os micos, em seus viveiros de moradia, são rotineiramente capturados e manipulados por experimentadores durante diversos tipos de procedimentos de manejo, o que pode ter contribuído para as respostas de medo/ansiedade

observadas frente a este estímulo. Já em termos do gato taxidermizado do teste de CP, vários fatores podem ter contribuído para a baixa responsividade apresentada pelos micos, entre elas: 1) a exposição repetida ao estímulo, 2) o confronto realizado em um ambiente altamente familiar, 3) a presença de um outro animal no viveiro (*social buffering*), 4) o uso de sujeitos com exposição prévia ao gato taxidermizado, e 5) o uso de um estímulo que não é uma ameaça real ao sujeito (Caine, 1990), facilitando a habituação do comportamento. Sabe-se que alguns aspectos do predador em si (ex. movimento) podem influenciar a resposta observada decorrente de um confronto (Blanchard e cols., 1997). Diante de um rato de laboratório vivo, um grupo de sagüis apresentou as mesmas reações de grito de alarme e olhar direto demonstradas frente a uma cobra viva (Hayes e Snowdon; 1990), indicando que o movimento do estímulo pode ser tão importante quanto o estímulo em si.

Vale ressaltar que as alterações comportamentais observadas, no Experimento 2, foram em resposta aos estímulos em si, uma vez que os micos não apresentaram modificações decorrente a presença dos observadores. Nas sessões de habituação – de ambos os experimentos – não foram observadas diferenças significativas dentre e entre as sessões. Já nas sessões de confronto, alterações foram observadas apenas no intervalo de EXP, quando o estímulo estava de fato presente, algumas das quais foram revertidas pela administração do DZP (Experimento 2). Saber identificar, rapidamente e com precisão, um estímulo ameaçador é, sem dúvida, vital para a sobrevivência de qualquer indivíduo. Contudo, após a retirada do estímulo, o perfil observado (POS) voltou rapidamente aos níveis iniciais (PRE), corroborando trabalhos anteriores que demonstraram que esses animais tendem a minimizar os altos custos de comportamentos anti-predatórios, retornando as suas atividades normais logo que a ameaça não é mais percebida (Caine, 1988; Dacier e cols., 2006).

#### **6.4. Perspectivas futuras**

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os testes de AH e CP corroboram achados anteriores em que se revelaram ser ferramentas úteis para avaliar respostas comportamentais de medo/ansiedade em calitriquídeos. Tendo sido conduzidos no ambiente social do próprio viveiro de moradia dos sujeitos e com uma curta duração, estas condições se assemelham mais ao que se acredita ocorrer no ambiente natural dessa espécie. Conseqüentemente, as alterações comportamentais geradas, e os efeitos da administração do DZP, podem corresponder mais a uma validade 'ecológica'. Contudo, as importantes diferenças observadas entre os dados obtidos neste trabalho e os de estudos anteriores – principalmente no teste de CP – sugere que alguns aspectos metodológicos podem influenciar significativamente a reações de calitriquídeos frente aos estímulos testados. Desta forma, novos estudos avaliando cada um dos fatores discutidos, como a duração e frequência das exposições, assim como os ambientes físicos e sociais do confronto, são necessários para uma melhor elucidação dos aspectos de medo/ansiedade sendo avaliados nestes testes e validação destes procedimentos como ferramentas experimentais.

## 7. CONCLUSÕES

- A exposição ao experimentador humano e ao predador taxidermizado induziu alterações comportamentais.
- A administração de diazepam reverteu poucos dos parâmetros comportamentais que foram alterados, ao contrário do que já foi observado em estudos anteriores.
- Exposição a ambos os estímulos não alterou as taxas de vigilância dos micos, mas houve uma resposta significativa em termos do olhar direto.
- Resultados comportamentais e da administração de diazepam podem ter sido influenciados por aspectos metodológicos:
  - **duração e/ou frequência de exposição**
  - **ambiente físico**
  - **ambiente social**
- Em geral, os dois estímulos parecem exercer efeitos similares nos micos, demonstrando uma possível validade concorrente, apesar do experimentador humano ter induzido um número mais significativo de respostas indicativas de medo/ansiedade.
- Os achados do presente estudo corroboram o fato de que os testes de Ameaça Humana e Confronto com Predador parecem ser ferramentas úteis para a avaliação do medo/ansiedade em calitriquídeos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Argyropoulos S. V., Sandford J. J. & Nutt, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology & Therapeutics*, 88: 213-227; 2000.

Barros, M., Boere, V., Huston, J.P. e Tomaz, C. Measuring fear and anxiety in the marmoset (*Callithrix penicillata*) with a novel predator confrontation model: effects of diazepam. *Behavioral Brain Research*, 108: 205-211; 2000.

Barros, M.; Mello, E. L.; Huston, J. P. e Tomaz, C. Behavioral effects of buspirone in the marmoset employing a predator confrontation test of fear and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 68: 255-262; 2001.

Barros, M. e Tomaz, C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 26: 187-201, 2002.

Barros, M.; Souza Silva, M. A.; Huston, J. P. e Tomaz, C. Anxiolytic-like effects of substance P fragment (SP<sub>1-7</sub>) in non-human primates (*Callithrix penicillata*). *Peptides*, 23: 967-973; 2002b.

Barros, M.; Mello Jr., E. L.; Maior, R. S.; Müller, C. P.; Souza Silva, M. A.; Carey, R. J.; Huston, J. P. e Tomaz, C. Anxiolytic-like effects of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY 100635 in non-human primates. *European Journal of Pharmacology*, 482: 197-203; 2003.

Barros, M.; Souza Silva, M. A.; Huston, J. P. e Tomaz, C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78: 357-367; 2004.

Barros, M.; Giorgetti, M.; Souto, A. A. V.; Vilela, G.; Santos, K.; Vilas Boas, N. e Tomaz, C. Persistent anxiety-like behavior in marmosets following a recent predatory stress

- condition: Reversal by diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 86: 705-711; 2007.
- Bateson, A. N. Basic Pharmacologic Mechanisms Involved in Benzodiazepine Tolerance and Withdrawal. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 5-215; 2002.
- Blanchard, D. C.; Griebel, G.; Rodgers, R. J e Blanchard, R. J. Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22 (5): 597-612; 1997.
- Blanchard, R. J.; Yang, M.; Li, C.; Gervacio, A. e Blanchard, D. C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25: 587-595, 2001.
- Brandão M. L. *Psicofisiologia – as bases fisiológicas do comportamento*. São Paulo: Editora Atheneu, p. 125-49; 2001.
- Buchanan-Smith, H. M. Exploration of unfamiliar areas and detection of potentially threatening objects in single-and mixed-species of tamarins. *International Journal of Comparative Psychology*, 12: 2-20; 1999.
- Buchanan-Smith, H. M; Anderson, D. A. e Ryan, C. W. Responses of cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) to faecal scents of predators and non-predators. *Animal Welfare*, 2: 17-32; 1993.
- Caine, N. G. Visual scanning by tamatins: a description of the behavior and tests of two derived hypotheses. *Folia Primatology*, 43: 59-67; 1984.
- Caine, N. G. Visual monitoring of threatening objects by captive tamarins (*Saguinus labiatus*). *American Journal of Primatology*, 10: 1-8; 1986.

- Caine, N. G. Vigilance, vocalizations, and cryptic behavior at retirement in captive groups of red-bellied tamarins (*Saguinus labiatus*). *American Journal of Primatology*, 12: 241-250; 1987.
- Caine, N. G. Flexibility and co-operation as unifying themes in *Saguinus* social organization and behaviour: role of predation pressures. In: Rylands, A. B. editor. *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology*. New York: Oxford Univ. Press, p. 200-19; 1993.
- Caine, N. G. Cutting costs in response to predatory threat by Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *American Journal of Primatology*, 46: 187-196; 1998.
- Caine, N. G. e Weldon, P. J. Responses by red-bellied tamarins (*Saguinus labiatus*) to fecal scents of predatory and non-predatory neotropical mammals. *Biotropica*, 21: 186-189; 1989.
- Carey, G. J., Costall, B., Domeney, A. M., Jones, D. N. C., e Naylor, R. J. Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 42: 143-153, 1992.
- Chebib, M. GABA<sub>C</sub> receptor ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 800-804; 2004.
- Cheney, D. L.; Wrangham, R. W.; Predation: In: Smuts, B. B.; Cheney, D. L.; Seyfarth, R. M.; Wrangham, R. W.; Struhsaker, T. T. (eds). *Primate societies*. Chicago: Chicago University Press, p. 227-239; 1987.
- Cilia, J. e Piper, D. C. Marmoset conspecific confrontation: an ethologically-based model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1): 85-91; 1997.
- Cooper, J. R.; Floyd, E. B.; Roth, R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology*, 7 ed. New York: Oxford University Press, 1996.

- 
- Costall, B.; Domeney, A. M.; Gerrard, P. A. e Naylor, R. J. A primate model for the assessment of anxiolytic drug action. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 95[suppl]: 670P; 1988.
- Cryan, J. F. e Kaupmann, K. Don't worry 'B' happy!: a role for GABAB receptors in anxiety and depression. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26(1): 36-42; 2005.
- Cunha, A. G. *Dicionário Etimológico Nova Fronteira da Língua Portuguesa*. 2ª edição: Rio de Janeiro, Nova fronteira, 1999.
- Dacier, A., Maia, R., Augustinho, D. P. e Barros, M. Rapid habituation of scan behavior in captive marmosets following brief predator encounters. *Behavioural Process*, 71: 66-69; 2006.
- Dalgleish, T. *The emotional brain*. *Nature*, 5: 582-589; 2004.
- Darwin, C. *The expression of the emotions in man and animals*. Chicago: University of Chicago Press, 1965 (1872).
- Dawson, G. A. The use of time and space by the Panamanian tamarin *Saguinus oedipus*. *Folia Primatology*, 31: 253-84; 1979.
- Deaking, J. F. W. e Graeff, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5: 305-315; 1991.
- Dettling, A. C. Early deprivation and behavioral and physiological responses to social separation/novelty in the marmoset. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73: 259-269; 2002.
- Epple, G. The behavior of the marmoset monkeys (Callitrichidae). In: Roseblum L, editor. *Primate behavior*, vol 4. New York: Academic Press. p. 195-239, 1975.

- Epple, G.; Belcher, A. M.; Kuderling, I.; Zeller, U.; Scolnock, L. e Greenfield, K. L.; Smith, A. B. Making sense out of scenes: species differences in scent glands, scent-marking behavior, and scent mark composition in the Callitrichidae. Em: Rylands, A. B. editor. *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour and ecology*. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 123-151; 1993.
- Fanselow, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. Em: Depaulis, A.; Bandler, R. (eds). *The midbrain periaqueductal grey matter: functional, anatomical and immunohistochemical organization*. New York: Plenum Press, p. 151-173, 1991.
- Ferrari, S. F. e Lopes-Ferrari, M. A. Predator avoidance behaviour in the buffy-headed marmoset, *Callithrix flaviceps*. *Primates*, 31: 323-338; 1990.
- Fluck, E.; Hogg, S.; Mabbutt, P. S. e File, S. E. Behavioural and neurochemical responses of male and female chicks to cat odour. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54: 85-91; 1996.
- Gibbs, M. E. e Johnston, G. A. R. Opposing roles for GABAA and GABAC receptors in short-term memory formation in young chicks. *Neuroscience*, 131: 567-576; 2005.
- Gilbert, S. E. A. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. *Developmental Biology*, 173: 357-372; 1996.
- Gilmer W. S. e McKinney W. T. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate models. *Journal of Affective Disorders*, 75: 97-113; 2003.
- Goldizen, A. W. Tamarins and marmosets: communal care of offspring. In: Smutts BB, Cheney, D. L.; Seyfarth, R. M.; Wrangham, R. W. e Struhsaker, T. T. editors. *Primate societies*, Chicago: University of Chicago Press. p. 34-43; 1987.
- Graeff, F. G. Ansiedade. Em: Graeff, F. G. e Brandão, M. L. (eds). *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos Editorial, p.109-144; 1996.

- 
- Graeff, F. G. Medicamentos ansiolíticos. Em: Graeff, F. G. e Guimarães, F. S. (eds). *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Editora Atheneu, p. 123-160; 1999.
- Graeff, F. G.; Netto, C. F. e Zangrossi Jr., H. The elevated T-maze as na experimental modelo f anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 23: 237-246; 1998.
- Graeff, F. G. e Hetem, L. A. B. Neurobiologia. Em Hetem, L. A. B. e Graeff, F. G. (org). *Transtornos de ansiedade* (p. 55-74). São Paulo: Atheneu, 2004.
- Gray, J. A. The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. New York: Oxford University Press, 1982.
- Hall, B. K. Homology: the hierarchical basis of comparative biology. New York: Academic Press, 1994.
- Hankerson, S.; Short, K.; Bachand, K. e Caine, N. Vigilance as a function of prior exposure to threat in Geoffroy's marmosets, *Callithrix geoffroy*. *American Journal of Primatology*, 54: 35; 2001.
- Hardie, S. M.; Buchanan-Smith, H. M. Vigilance in single and mixed-species groups of tamarins (*Saguinus labiatus* and *S. fuscicollis*). *International Journal of Primatology*, 18: 217-34; 1997.
- Hayes, S. L. e Snowdon, C. T. Predator recognition in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *American Journal of Primatology*, 20: 283-291; 1990.
- Hendrie, C. A.; Weiss, S. M. e Eilam, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. *Pharmacological Biochemistry and Behavior*, 54: 13-20; 1996.

- Heymann, E. W. A field observation of predation on a moustached tamarin (*Saguinus mystax*) by anaconda. *International Journal of Primatology*, 8: 193-195; 1987.
- Heymann, E. W. Reactions of wild tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*, to avian predators. *International Journal of Primatology*, 11: 327-337; 1990.
- Johnson, E. O.; Kamilaris, T. C.; Carter, C. S.; Calogero, A. E.; Gold, P. W. e Chrousos, G. P. The behavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biological Psychiatry*, 40: 317-337; 1996.
- Johnston, G. A. R.; Burden, P. M.; Chebib, M e Mewett, K. N. Neurologically active compounds. PCT. International Application, WO 98;58939; 1998.
- Kalin, N. H.; Shelton, S. E. e Barksdale, C. M. Separation distress in infant rhesus monkeys: effects of diazepam and RO 15-1788. *Brain Research*, 408: 192-198; 1987.
- Katzung, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica* (8 ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- Kim, J. e Gorman, J. The psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*, 4: 335-347; 2005.
- King, F. A.; Yarbrough, C. J.; Anderson, D. C.; Gordon, T. P e Gould, K. G. Primates. *Science*, 240: 1475-1482; 1988.
- Kitchen, A. M. e Martin, A. A. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive commom marmosets, *Callithrix jacchus jacchus*. *Laboratory Animals*, 30: 317-26; 1996.
- Koenig, A. Visual scanning by commom marmosets (*Callithris jacchus*): functional aspects and the social role of adult males. *Primates*, 39: 85-90; 1998.

---

LeDoux, J. E. *The emotional brain*. New York: Simon and Schuster, 1996.

LeDoux, J. E. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biological Psychiatry*, 44: 1229-1238; 1998.

Machado, J.P. *Dicionário Etimológico da Língua Portuguesa*. Lisboa: Livros Horizonte, 1995.

Machado, A. B. M. *Neuroanatomia Funcional*. São Paulo: Atheneu, 2006.

MacLean, P. D. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Clinical Neurophysiology*, 4: 407-418; 1952.

McNaughton, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity – a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56: 603-611; 1997.

Millan, M. J. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70: 84-244; 2003.

Nesse, R. M. Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23: 895-903; 1999.

Newman, J. D. e Farley, M. J. An ethologically based, stimulus and gender-sensitive nonhuman primate model of anxiety. *Progress in Neuropsychopharmacology Biology and Psychiatry*, 19: 677-685, 1995.

- Norcross, J. L. e Newman, J. D. Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology*, 47: 209-222; 1999.
- Pan, Y.; Khalili, P.; Ripps, H. e Qian, H. Pharmacology of GABAC receptors: responses to agonists and antagonists distinguish A- and B- subtypes of homomeric  $\rho$  receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters*, 376: 60-65; 2005.
- Peres, C. A. Anti-predation benefits in a mixed-species group of Amazonian tamarins. *Folia Primatology*, 61: 61-76; 1993.
- Pook, A. G.; Pook, G. Polyspecific association between *Saguinus fuscicollis*, *S. labiatus*, *Callimico goeldii*, and other primates in northwestern Bolivia. *Folia Primatology*, 38: 196-216; 1982.
- Reis, F. P.; Erhart, E. A. The brain of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Acta Anatomy*, 103: 350-357; 1979.
- Ribas, G. C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 29(1): 63-71; 2007.
- Rodgers, R. J.; Cao, B.J.; Dalvi, A.; Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30:289-304; 1997.
- Rogers, D. C.; Costall, B.; Domeney, A. M.; Gerrard, P. A.; Greener, M.; Kelly, M. E.; Hagan, J. J. e Hunter, A. J. Anxiolytic profile of ropinirole in the rat, mouse and common marmoset. *Psychopharmacology*, 151: 91-97; 2000.
- Rowlett, J. K.; Platt, D. M.; Lelas, S.; Atack, J. R. e Dawson, G. R. Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102(3): 915-920; 2005.

- 
- Rudolph, U. e Möhler, H. Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor functions and dissection of pharmacology of benzodiazepines and general anaesthetics by mouse genetics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44:475-498; 2004.
- Rudolph, U e Möhler, H. GABA-based therapeutics approach: GABA<sub>A</sub> receptor subtype functions. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 18-23; 2006.
- Sainsbury, A. W.; Mew, J. A.; Purton, P.; Eaton, B. D. e Cooper, J. F. Advances in the management of primates kept for biomedical research. *Animal Technology*, 41: 87-101; 1990.
- Sandford J. J.; Argyropoulos S.V. & Nutt D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 88: 197-212; 2000.
- Sapolsky, R.M. Why stress is bad for your brain. *Science*, august 9, 273(5276): 749-50; 1996.
- Savage, A.; Snowdon, C. T.; Giraldo, L. H.; Soto, L. H. Parental care patterns and vigilance in wild cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). In: Norconk, M. A., Rosenberger, A. L.; Garber, P. A. editors. Adaptive radiations of neotropical primates. New York: Plenum, p. 187-99; 1996.
- Searcy, Y.M.; Caine, N.G. Hawk calls elicit alarm and defensive reactions in captive Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *Folia Primatology*, 74: 115-125; 2003.
- Smith, T. E.; McGreer-Whitworth, B. e French, J.A. Close proximity of the heterosexual partner reduces the physiological and behavioral consequences of novel-cage housing in black tuftedear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Hormones & Behavior*, 34: 211-222; 1998.
- Stellar, E. The marmoset as a laboratory animal: maintenance, general observations of behavior, and simple learning. *Journal of Comparative Physiology - Psychology*, 53: 1-10; 1960.

- 
- Stevenson, M. F. e Rylands, A. B. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier, R. A., Rylands, A. B., Coimbra-Filho, A e Fonseca, G. A. B., eds. Ecology and behavior of neotropical primates. Contagem/Brazil: Littera Maciel Ltda./WWF: 131-222, 1988.
- Sussman, R. W.; Kinzey, W. G. The ecological role of the Callitrichidae: a review. *American Journal of Physiology and Anthropology*, 64: 419-49; 1984.
- Tardif, S. D.; Carson, R.I.; Gangaware, B. L. Comparison of infant groups of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cotton-top tamarin (*Saguinus aedipus*). *American Journal of Primatology*, 11: 103-10; 1986.
- Tomaz, C.; Dickinson-Anson, H.; McGaugh, J. L; Souza-Silva, M. A.; Viana, M. B.; Graeff, F. G. Localization in the amygdala of the amnestic action of diazepam on emotional memory. *Behavioral and Brain Research*, 58: 99-105; 1993.
- Treit, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 9: 203-222; 1985.
- Vellucci, S. V. Primate social behaviour – anxiety and depression. *Pharmacology and Therapeutics*, 47: 167-180; 1990.
- Wafford, K. A. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Current Opinion in Pharmacology*, 5: 47-52; 2005.
- Winslow, J. T.; Parr, L. A. e Davis, M. Acoustic startle, prepulse inhibition, and fear-potentiated startle measured in rhesus monkeys. *Biological Psychological*, 51(11): 859-866; 2002.
- Winslow, J. T.; Noble, J. T. e Davis, M. Modulation of fear-potentiated startle and vocalizations in juvenile rhesus monkeys by morphine, diazepam and buspirone. *Biological Psychological*, 61(3): 389-395; 2007.

- 
- Zangrossi Jr., H. Modelos animais de ansiedade. In: Hetem, L. A. B.; Graeff, F. G. (eds). *Ansiedade e transtornos de ansiedade*. São Paulo: Editora Científica Nacional, p. 85-120; 1997.
- Zhang, J.; Zhang, Z. e Wang, Z. Scent, social status and reproductive conditions in rat-like hamsters (*Cricetulus triton*). *Physiology & Behavior*, 74: 415-420; 2001.

## **ANEXOS**

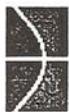
---

**Anexo 1:** Parecer do comitê de ética no uso animal

**Anexo 2:** Discriminação dos sujeitos utilizados nos experimentos 1 e 2.

**Anexo 3:** Tabelas dos resultados obtidos para o monitoramento aéreo e terrestre nos experimentos 1 e 2.

# ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 07 de março de 2006.

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE AS RESPOSTAS DE VIGILÂNCIA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS EM DOIS TESTES EXPERIMENTAIS DE MEDO/ANSIEDADE: CONFRONTO COM PREDADOR VS. "AMEAÇA HUMANA", sob responsabilidade da Profa. Dra. Marília Barros, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

  
Profa. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Coordenadora do CEUA

**ANEXO 2**

Discriminação dos sujeitos utilizados nos experimentos 1 e 2.

Sujeito	Experimento			
	# 1		# 2	
	ingênuo	experiente	ingênuo	experiente
Bela	---	---		X
Bia		X		X
Bila	---	---		X
Cibele	---	---	---	---
Davi	X			X
Dinho	---	---		X
Fantasma	X			X
Golias	---	---	---	---
Mara		X		X
Michele		X	---	---
Miguel	---	---		X
Miriam		X	---	---
Mixo	X		---	---
Nana	X		---	---
Nhonho	X		---	---
Rui		X		X
Sula		X	---	---
Valdemiro		X	---	---
Valquíria	---	---		X
Vanessa	X		---	---
Vanússia	---	---	---	---
<b>Total</b>	<b>06</b>	<b>07</b>	<b>00</b>	<b>10</b>

## ANEXO 3

**Tabela A:** Frequência e duração média ( $\pm$ e.p.m.) em segundos do comportamento de monitoramento aéreo do Experimento 1, nas quatro sessões de habituação (H1–H4), nas quatro sessões de confronto com o experimentador do teste de Ameaça Humana (DZP 0–3 mg/kg) e nas quatro sessões de confronto com o gato taxidermizado no teste de Confronto com Predador (DZP 0–3 mg/kg).

	Frequência <sup>2</sup>			Duração <sup>3</sup>		
	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>
<i>Habituação</i>						
H1	0,3 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 1,3	4,8 $\pm$ 2,2
H2	0,5 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 2,2	5,7 $\pm$ 2,7	10,8 $\pm$ 6,1
H3	1,4 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,4	10,3 $\pm$ 4,9	13,0 $\pm$ 6,5	8,9 $\pm$ 4,1
H4	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	25,3 $\pm$ 15,8	25,5 $\pm$ 14,9	5,3 $\pm$ 2,2
<i>Ameaça Humana</i>						
DZP0	1,3 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 3,4	3,8 $\pm$ 2,1	4,8 $\pm$ 2,1
DZP1	0,5 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 1,9	0,5 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 1,4
DZP2	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 3,0	1,6 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,8
DZP3	0,5 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 4,3	1,4 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 1,9
<i>Confronto com Predador</i>						
DZP0	0,6 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 1,8	2,5 $\pm$ 2,2	4,4 $\pm$ 2,3
DZP1	0,9 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,4	10,2 $\pm$ 5,9	4,7 $\pm$ 2,9	12,7 $\pm$ 8,0
DZP2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 1,4
DZP3	0,6 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,8	2,6 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,6

<sup>1</sup> PRE=intervalo de pré-exposição; EXP=intervalo de exposição; POS=intervalo de pós-exposição.

<sup>2</sup> *Habituação*: entre sessões – F(3,12)=1,61; p=0,20; entre intervalos – F(2,36)=1,66; p=0,21; interação – F(6,24)=0,85; p=0,53; *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,12)=2,43; p=0,06; entre intervalos – F(2,48)=1,51; p=0,24; interação – F(8,24)=1,08; p=0,39; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,12)=1,47; p=0,23; entre intervalos – F(2,48)=1,57; p=0,23; interação – F(8,24)=1,04; p=0,41.

<sup>3</sup> *Habituação*: entre sessões – F(3,12)=0,67; p=0,42; entre intervalos – F(2,36)=0,78; p=0,47; interação – F(6,24)=1,47; p=0,20; *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,12)=1,54; p=0,21; entre intervalos – F(2,48)=2,77; p=0,08; interação – F(8,24)=1,14; p=0,34; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,12)=1,28; p=0,29; entre intervalos – F(2,48)=0,59; p=0,56; interação – F(8,24)=1,59; p=0,14.

**Tabela B:** Freqüência e duração média ( $\pm$ EPM) em segundos do comportamento de monitoramento terrestre do Experimento 1, nas quatro sessões de habituação (H1–H4), nas quatro sessões de confronto com experimentador do teste de Ameaça Humana (DZP 0–3 mg/kg) e nas quatro sessões de confronto com um gato taxidermizado no teste de Confronto com Predador (DZP 0–3 mg/kg).

	Freqüência <sup>2</sup>			Duração <sup>3</sup>		
	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>
<i>Habituação</i>						
H1	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 1,4
H2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,4
H3	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,7
H4	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,7
<i>Ameaça Humana</i>						
DZP0	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
DZP1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 1,2	5,5 $\pm$ 3,5
DZP2	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 1,6	2,6 $\pm$ 1,8	0,6 $\pm$ 0,4
DZP3	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 3,0	2,4 $\pm$ 1,4	1,3 $\pm$ 1,3
<i>Confronto com Predador</i>						
DZP0	0,5 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 1,6	0,9 $\pm$ 0,8
DZP1	0,9 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 1,6	0,7 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 1,2
DZP2	0,5 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,5	7,5 $\pm$ 5,8
DZP3	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,5

<sup>1</sup>PRE=intervalo de pré-exposição; EXP=intervalo de exposição; POS=intervalo de pós-exposição.

<sup>2</sup>*Habituação*: entre sessões – F(3,12)=1,11; p=0,36; entre intervalos – F(2,36)=0,34; p=0,71; interação – F(6,24)=1,14; p=0,35; *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,12)=0,88; p=0,48; entre intervalos – F(2,48)=0,26; p=0,77; interação – F(8,24)=1,09; p=0,37; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,12)=1,25; p=0,30; entre intervalos – F(2,48)=2,85; p=0,08; interação – F(8,24)=1,37; p=0,22.

<sup>3</sup>*Habituação*: entre sessões – F(3,12)=1,53; 0,23; entre intervalos – F(2,36)=0,11; p=0,90; interação – F(6,24)=1,04; p=0,41; *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,12)=0,81; p=0,53; entre intervalos – F(2,48)=0,30; p=0,74; interação – F(8,24)=1,19; p=0,32; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,12)=1,01; p=0,41; entre intervalos – F(2,48)=1,52; p=0,24; interação – F(8,24)=0,88; p=0,53.

**Tabela C:** Freqüência e duração média ( $\pm$ EPM) em segundos do comportamento de monitoramento aéreo dos Experimentos 2 e 3, incluindo as duas sessões de habituação (H1–H2), as quatro sessões de confronto com experimentador do teste de Ameaça Humana (DZP 0–0,50 mg/kg) e as quatro sessões de confronto com um gato taxidermizado e um modelo de cobra no teste de Confronto com Predador (DZP 0–0,5 mg/kg).

	Freqüência <sup>2</sup>			Duração <sup>3</sup>		
	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>
<i>Ameaça Humana</i>						
H 1	1,1 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 2,1	0,8 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,7
H 2	1,0 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 2,1	2,0 $\pm$ 1,2	2,0 $\pm$ 1,2
DZP 0	2,2 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,5	17,5 $\pm$ 5,7	3,1 $\pm$ 1,2 *	7,7 $\pm$ 3,6
DZP 0,10	2,0 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,6	15,6 $\pm$ 6,1	7,8 $\pm$ 4,8	8,9 $\pm$ 4,7
DZP 0,25	2,3 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,6	20,7 $\pm$ 5,9	7,8 $\pm$ 3,4 *	8,0 $\pm$ 3,4
DZP 0,50	1,7 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 4,1	2,9 $\pm$ 0,8 *	4,7 $\pm$ 1,6
<i>Confronto com Predador</i>						
H 1	1,5 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,5	9,0 $\pm$ 4,2	11,5 $\pm$ 5,7	11,8 $\pm$ 4,6
H 2	1,1 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,4	11,9 $\pm$ 5,9	7,9 $\pm$ 3,7	7,7 $\pm$ 4,0
DZP 0	1,0 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 2,7	3,1 $\pm$ 2,5	14,2 $\pm$ 7,6
DZP 0,10	1,6 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	11,8 $\pm$ 5,7	2,6 $\pm$ 1,8	7,2 $\pm$ 3,0
DZP 0,25	1,0 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 1,8	3,8 $\pm$ 2,3	3,3 $\pm$ 1,8
DZP 0,50	1,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 2,2	2,9 $\pm$ 2,0	8,3 $\pm$ 3,3

<sup>1</sup> PRE=intervalo de pré-exposição; EXP=intervalo de exposição; POS=intervalo de pós-exposição.

<sup>2</sup> *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,9)=1,43; p=0,24; entre intervalos – F(2,36)=6,36; p=0,01; interação – F(8,18)=0,85; p=0,57; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,9)=0,18; p=0,95; entre intervalos – F(2,36)=10,25; p=0,001; interação – F(8,18)=0,47; p=0,87.

<sup>3</sup> *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,9)=1,25; p=0,31; entre intervalos – F(2,36)=12,07; p<0,001; interação – F(8,18)=0,84; p=0,57; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,9)=0,71; p=0,92; entre intervalos – F(2,36)=1,46; p=0,26; interação – F(8,18)=1,16; p=0,34.

**Tabela D:** Freqüência e duração média ( $\pm$ EPM) em segundos do comportamento de monitoramento terrestre dos Experimentos 2 e 3, incluindo as duas sessões de habituação (H1–H2), as quatro sessões de confronto com experimentador do teste de Ameaça Humana (DZP 0–0,50 mg/kg) e as quatro sessões de confronto com um gato taxidermizado e um modelo de cobra no teste de Confronto com Predador (DZP 0–0,5 mg/kg).

	Freqüência <sup>2</sup>			Duração <sup>3</sup>		
	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>	PRE <sup>1</sup>	EXP <sup>1</sup>	POS <sup>1</sup>
<i>Ameaça Humana</i>						
H 1	0,6 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 2,2	0,7 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 2,5
H 2	0,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 5,7	1,3 $\pm$ 0,9
DZP 0	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,7	1,2 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 1,7
DZP 0,10	0,4 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,6
DZP 0,25	1,0 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 2,4	1,4 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 1,4
DZP 0,50	0,8 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 1,8	1,4 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,9
<i>Confronto com Predador</i>						
H 1	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,1
H 2	0,7 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,4
DZP 0	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,6
DZP 0,10	0,3 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 2,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,3
DZP 0,25	0,1 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 2,3	0,7 $\pm$ 0,6
DZP 0,50	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 1,3	0,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,8

<sup>1</sup> PRE=intervalo de pré-exposição; EXP=intervalo de exposição; POS=intervalo de pós-exposição.

<sup>2</sup> *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,9)=1,06; p=0,39; entre intervalos – F(2,36)=0,15; p=0,86; interação – F(8,18)=1,13; p=0,36; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,9)=1,56; p=0,21; entre intervalos – F(2,36)=0,41; p=0,67; interação – F(8,18)=1,05; p=0,41.

<sup>3</sup> *Ameaça Humana*: entre sessões – F(4,9)=0,86; p=0,50; entre intervalos – F(2,36)=0,12; p=0,89; interação – F(8,18)=1,65; p=0,13; *Confronto com Predador*: entre sessões – F(4,9)=0,64; p=0,64; entre intervalos – F(2,36)=1,09; p=0,36; interação – F(8,18)=1,67; p=0,12.