Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-graduação em Psicobiologia

Avaliação da exposição prévia a estímulos estressores aversivos inatos e aprendidos sobre o comportamento agressivo de camundongos (*Mus musculus albinus*): influência de mecanismos GABAérgicos e dopaminérgicos

Aluno: João Soares da Cunha Neto

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo

Ribeirão Preto – SP

2018

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia
Programa de Pós-graduação em Psicobiologia

Avaliação da exposição prévia a estímulos estressores aversivos inatos e aprendidos sobre o comportamento agressivo de camundongos (*Mus musculus albinus*): influência de mecanismos GABAérgicos e dopaminérgicos

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Jorge Nobre do Espírito Santo

Apoio financeiro CNPq e CAPES

Versão corrigida
Ribeirão Preto – SP
2018

Dedico este trabalho aos meus pais Cristina e Jonas, avó, irmão, demais familiares e amigos próximos. Por todo amor, apoio e carinho que me deram nessa jornada por “mares nunca antes navegados”. “Rir é o melhor remédio”, rir com vocês é melhor ainda’

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada sou ou serei. O temor do Senhor é o princípio da sabedoria – Provérbios 9, v 10.

Agradeço a minha mãe **Cristina**, por sempre me suportar (em todos os sentidos) e sempre demonstrar o seu AMOR, mesmo “furado” e “pintado”. Obrigado por todos os abraços, beijos, cheiros, mensagens e ligações.

Agradeço ao meu pai **Jonas**, por todos os conselhos, direcionamentos, carinho, atenção, dicas e orientações, em TODOS os âmbitos da minha vida.

Agradeço a minha avó Raimunda (**Mãe neném**), por todos os ensinamentos e mimos. O muito que aprendi longe dos livros e salas de aula, aprendi contigo. Obrigado

Agradeço ao meu irmão **Elder**, minha cunhada **Klissia**, meus sobrinhos **Judá** e **Hannah**, obrigado por tudo.

Agradeço a minha irmã de coração **Denise**, por sempre ficar na torcida, mesmo que distante. Preta, você é dez.

Agradeço imensamente ao meu orientador **Jorge**. Sem você eu literalmente não imagino como terminaria esse trabalho. Obrigado pelo voto de confiança e por ter dado “a cara a tapa”. Obrigado pelas conversas, discussões, ensinamentos, puxões de orelha e risadas. *Estou te devendo todas as tijucas que quiser.*

Agradecimento a professora **Alma** Blasida Concepción Elizaur Benitez Catirse. Obrigado por tudo que a senhora fez por mim.

Agradeço as amigas antigas: **Silas**, **Karina**, **Eduardo**, **Martin**, **Kézia**, Tio **Rico**, Tia **Beth**, Tia **Lilian**, e todos que torceram por mim (de quase três mil quilômetros de distância). Obrigado

Agradeço as amigadas novas: **Alessandra Junqueira**, por todo carinho. Adoro você e sua família. Um beijo no João e no Joaquin; **Silvia Sanches**, pelo companheirismo, apoio, incentivo e carinho. “*Você é a melhor de todas*”. Um beijo gordinha; **Luciene Leme**, pelas bagunças, músicas, festas e tudo mais. Valeu Tum; **Fabio Damasceno**, pela companhia no bandeirão, amizade, dicas de alemão e etc; **Nathália Santos**, pelo companheirismo e carinho na reta final; **Rodrigo Mazzei**, pelas zoeiras, graças, risos e conversas; **Rafael Bonuti**, obrigado pelas dicas e conversas desestressantes. **Tania Riul**, obrigado por tudo. Nosso contato foi curto mais nossas conversas muito profundas e edificantes. Você é uma das razões por essa tese ter folhas de agradecimentos. Muito obrigado.

Agradeço aos companheiros de laboratório que torceram por mim: Fran e Lucas. Valeu galera pelas conversas, discussões, desabafos e parceria.

Agradeço as demais pessoas que passaram pela minha vida nesses anos aqui em Ribeirão Preto. Vocês foram importantes.

Agradeço muitíssimo aos membros da banca de defesa pelos comentários, dicas, puxões de orelha, indagações e voto de confiança. Professor Wagner, Professora Julia, Professora Patrícia e Professora Renata, muito obrigado.

Agradeço a USP e ao Pós-Graduação em Psicobiologia, seus docentes e funcionários. Ensinos que levarei para a vida toda e para toda vida.

“O destino é inexorável”

- Bernard Cornwell

RESUMO

Os animais são expostos a diferentes situações que podem colocar em risco sua sobrevivência. Na natureza estas situações, em geral, eliciam medo e ou ansiedade. A agressão é um conjunto de comportamentos direcionados a um indivíduo co – específico, ou não, que tem como objetivo a aquisição de recursos ou proteção em situações de risco à sobrevivência. Considerando a interação entre medo/ansiedade e agressividade, este trabalho teve como objetivo estudar se essas situações podem modificar o comportamento agressivo em camundongos. O propósito deste estudo foi investigar se a pre-exposição de camundongos a estímulos estressores incondicionados (campo aberto, labirinto em cruz elevado, exposição ao rato, exposição a odor de rato) e condicionados (choque nas patas) podem modular o futuro comportamento agressivo em camundongos. Para atingir esse objetivo, os animais foram previamente expostos a diferentes situações capazes de provocar um estado de ansiedade e/ou medo e posteriormente submetidos ao encontro agonístico (teste residente intruso). As alterações na reatividade emocional induzidas pelas variáveis independentes foram medidas usando a resposta de sobressalto potencializado pelo medo e a análise de vocalizações ultrassônicas. Devido à influência relevante da neurotransmissão de GABA na agressão, as mudanças comportamentais induzidas pelas variáveis utilizadas foram associadas com o benzodiazepínico diazepam. Os dados obtidos no presente estudo após análise mostrou que a pré-exposição de camundongos a situações aversivas que provocam medo e / ou ansiedade alteram o seu comportamento.

Palavras-chave: Agressão, Camundongos, Medo, Ansiedade, Paradigma Residente-Intruso, Vocalização Ultrassônica, GABA, Dopamina.

ABSTRACT

Aggression is defined as a behavioral repertoire mainly directed to a conspecific for acquisition of resources and protection. In this context, anxiety and fear-like behaviors is commonly triggered by these survivors' situations. Since aggression and fear are highly correlated in the present study we investigated whether previous exposure to environmental unconditioned (*rat presence and rat odor, open field and elevated plus-maze tests, foot-shocks*) and conditioned aversive stimuli (fear-potentiated startle) can modulate future aggressive behavior in mice. To achieve this goal, the animals were previously exposed to different situations able to elicit a state of anxiety and/or fear and later submitted to the agonistic encounter. Changes on the emotional reactivity induced by the independent variables used were measured using the fear-potentiated startle response and ultrasonic vocalizations analysis. Due to the relevant influence of GABA neurotransmission on aggression, behavioral changes induced by the variables used were challenged with the prototypic benzodiazepine diazepam. In addition, regarding human aggression, the most effective and enduring pharmacological intervention rely on compounds that act as dopaminergic antagonists. Therefore, in our study, in order to verify the influence of dopamine neurotransmission on the modulation of aggression pharmacological manipulation was conducted with the systemic administration of the dopamine D2 agonist apomorphine. Both drugs were administered previously to the resident-intruder test. The data obtained in the present study after analysis show that the pre-exposure to aversive situations that trigger fear and/or anxiety changes mice behavior.

Keywords: Aggression, Mice, Fear, Anxiety, Resident-Intruder Paradigm, Ultrasonic Vocalization, GABA, Dopamine.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	6
1.1. CONTROLE DAS EMOÇÕES	7
1.2. AGRESSÃO E COMPORTAMENTO AGRESSIVO	8
1.3. O PARADIGMA DO RESIDENTE – INTRUSO	10
1.4. APETITIVO x CONSUMATÓRIO	12
1.5. AGRESSÃO E AVALIAÇÃO DE RISCO	12
1.6. MEDO E ANSIEDADE	16
1.7. AGRESSÃO: RESPOSTAS CONDICIONADAS E INCONDICIONADAS	19
1.8. AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS INCONDICIONADAS	20
1.9. AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS CONDICIONADAS	21
1.10 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS	22
1.11. BASES NEUROFARMACOLÓGICAS DA AGRESSÃO	23
2. Objetivos	27
3. Método	30
3.1. Sujeitos	31
3.2. Ética Animal	31
3.3. Protocolos Experimentais	32
3.3.1. Parte 1 (Estudo etológico)	32
3.3.1.1. Aparatos e Procedimentos	32
3.3.1.1.1 <i>Paradigma Residente – Intruso</i>	33
3.3.1.1.2 <i>Teste do Campo Aberto</i>	35
3.3.1.1.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	36
3.3.1.1.4 Exposição a Rato (ER)	37
3.3.1.1.5 Exposição a Odor de Rato (EOR)	38
3.3.2. Parte 2 (Estudo farmacológico)	39

3.3.2.1. Aparatos e Procedimentos	39
3.3.2.1.1 Choque nas patas (Choque)	40
3.3.2.1.2. Sobressalto Potencializado pelo Medo	41
3.3.2.1.3. Vocalização Ultrassônica	42
3.3.2.1.4. Drogas utilizadas	43
3.4. Eutanásia	44
3.5. Análise estatística	44
4. Resultados	46
5. Discussão	61
REFERÊNCIAS	70

1. Introdução

1.1. CONTROLE DAS EMOÇÕES

As emoções podem ser conceptualizadas como manifestações de reações cognitivas, fisiológicas e comportamentais, desencadeadas no organismo como consequência de sua exposição a estímulos estressores ambientais ou endógenos (BRANDÃO, 2004). Portanto, emoções se apresentam como estados do organismo que potencializam a expressão de comportamentos apropriados às demandas ambientais (WAAL, 2011).

Numa perspectiva ecoetológica, mamíferos humanos e não humanos compartilham características fundamentais, como é o caso, da resposta emocional frente a uma situação aversiva (BLANCHARD; BLANCHARD, 2003). É possível, portanto, que uma situação ameaçadora possa desencadear uma resposta similar espécie-específica em humanos e nos demais mamíferos (WALLACE, 2014). Apesar de uma aparente redução no interesse em se estudar as emoções em meados do século XX por conta do início e explosão dos estudos de cognição (LEDOUX, 2000), atualmente, as neurociências tem novamente se voltado para o estudo das emoções; de fato, mais recentemente tem-se sugerido a forte inter-relação existente entre processos cognitivos e emocionais (STORBECK; CLORE, 2007). O controle das emoções é encefálico e agrega também áreas localizadas no tronco cerebral assim como áreas corticais. Entretanto, tem em vista o fato de ser um termo que está caindo em desuso, este controle é mais especificamente orquestrado pelo *sistema límbico*, um sistema complexo composto pelo hipocampo, hipotálamo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal, dentre outras áreas (CANTERAS, 2002; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; DE BOER et al., 1999; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; HESS; BRUGGER, 1943; KINCHESKI et al., 2012; MCGREGOR; HERBERT, 1992). Estas áreas estão sob a ação de diversos sistemas de neurotransmissores (acetilcolina, adrenalina, serotonina, noradrenalina, dopamina,

GABA e etc.), realizando dessa forma a modulação e o controle das emoções (BRANDÃO, 2004).

A maioria dos estudos realizados no campo das ciências básicas se valem de modelos animais. Estes podem ser definidos como modelos teórico/práticos que permitem a redução de um fenômeno aos seus aspectos essenciais, na intenção de estudá-los ou replicá-los (GOUVEIA JR, 1999). Modelo animal, como ferramenta de análise no estudo do comportamento, é um composto contendo aparato específico que está associado a um procedimento que caracteriza manipulação relativa a uma categoria ou classe de comportamentos que simulam uma situação natural/ambiental (MAXIMINO; BRITO; GOUVEIA JR, 2006). O uso de modelos animais em testes comportamentais é de grande valia para aferir o efeito de novas drogas em diversos transtornos mentais (BLANCHARD; BLANCHARD, 2003; CANTERAS; MOTA-ORTIZ; MOTTA, 2012; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; SAITO; BRANDÃO, 2015).

1.2. AGRESSÃO E COMPORTAMENTO AGRESSIVO

De forma geral, quando alguém se refere a comportamento agressivo ou agressão, a primeira coisa que pensamos é a palavra ou a ideia de “violência”. Entretanto, de modo geral estes fenômenos não estão diretamente relacionados, muito menos tem o mesmo significado. O estudo da violência é um campo vasto dentro da psicologia, psiquiatria e sociologia (GOTHELF; APTER; VAN PRAAG, 1997; ROSELL; SIEVER, 2015; SIEGEL et al., 2007). O *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM-V) não classifica violência como transtorno mental, entretanto, enquadra esse comportamento como critério associado ou componente presente em um quadro de uma determinada psicopatologia ou atrelada à mesma

como, por exemplo, violência sexual de cônjuge ou parceiro ou transtorno explosivo intermitente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Uma rápida pesquisa nas maiores bases de dados (PubMed, Science Direct e Scopus) usando "comportamento agressivo" ou "agressão" como palavras-chave mostra que a maioria dos artigos tem como base a violência de fato, com alguns poucos abordando diretamente o comportamento agressivo. Isto, porém, é algo que vem mudando nos últimos anos.

A emissão de um conjunto de respostas/comportamentos espécie-específica na busca de recursos ou proteção de recursos em risco é uma definição simples para comportamento agressivo. Esses recursos podem ser fonte de alimento, bem-estar, parceiro reprodutor, prole e habitat (ALCOOK, 2013; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; MCGREGOR; PEAKE; LAMPE, 2001; ODUM, 1954; OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998). Ou seja, a agressão é um comportamento que apresenta uma função biológica, uma função para a sobrevivência do indivíduo e perpetuação da espécie. Quando se estuda a agressão em animais é importante considerar o significado etológico do comportamento, aí incluídos seu desenvolvimento filogenético e ontogenético assim como sua função para o indivíduo e a espécie. Sinais, posturas e atos agressivos são comportamentos que ocorrem na defesa de território ou prole (agressão territorial e maternal), para sobrevivência e reprodução (agressão a um intruso pelo residente) ou como resposta à frustração ou medo (MICZEK et al., 2001).

Na natureza pelo ponto de vista biológico, animais foram selecionados ao longo das eras com os aparatos comportamentais, fisiológicos e anatômicos de melhor adaptação ao ambiente frente aos estímulos à que foram expostos. Como vantagem adaptativa, alguns animais, por exemplo, grandes mamíferos, se valem do porte físico desenvolvido, enquanto que outros, utilizam venenos e peçonhas como répteis e anfíbios, ou plumas, ossos

pneumáticos e sacos aéreos como as aves, etc. (ODUM, 1954). Os animais estão em constante busca por fonte de alimento, que faz com que tenham energia para a aquisição e manutenção dos demais recursos (bem-estar, parceiro reprodutor, prole e habitat) (ALCOOK, 2013). A constante busca e/ou proteção de recursos é uma das clássicas relações ecológicas desarmônicas interespecíficas, que coloca o indivíduo em uma situação de risco. Algo compartilhado por todos os animais e, no caso de uma grande parcela, acompanhada do comportamento agressivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 2003).

A competição intraespecífica (ou coespecífica), ou seja, de indivíduos de uma mesma espécie por recursos como, por exemplo, um território de alta qualidade, é uma das definições clássicas de relação ecológica do tipo desarmônica, criando a partir disso um vencedor e um perdedor (ODUM, 1954); duas posições que são a base do paradigma do residente-intruso (DE BOER et al., 1999). O vencedor terá para si um ambiente melhor que lhe proporcionará mais recursos e de melhor qualidade, enquanto que para o perdedor restará uma área que, na melhor das hipóteses, lhe dará apenas as condições mínimas para sua sobrevivência, “forçando” o mesmo a interagir com outros coespecíficos com a finalidade de novas tentativas de adquirir melhores recursos, ou então, em última instância, mudar de local (ALCOOK, 2013; ODUM, 1954).

1.3. O PARADIGMA DO RESIDENTE – INTRUSO

Estudos anteriores envolvendo interação coespecífica sugeriram que “vencer” em um confronto agressivo aumenta a probabilidade de que um indivíduo se comporte agressivamente no futuro (GINSBURG; ALLEE, 2016; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; MCGREGOR; PEAKE; LAMPE, 2001; MICZEK et al., 2001). A capacidade de decidir

lutar ou não, com base na observação do comportamento agressivo de um coespecífico, foi observada em peixes (OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998) e em roedores (ARCHER, 2009). Demonstrando assim que as respostas de agressividade podem ser positivamente reforçadas (BANNAI et al., 2007; FISH et al., 2008; FISH; DEBOLD; MICZEK, 2005; MICZEK et al., 2002). De forma mais específica, utilizando o teste residente–intruso, os comportamentos agressivos emitido pelos camundongos residentes foram reforçados pela apresentação de um intruso na caixa onde os residentes eram mantidos. (FISH; DEBOLD; MICZEK, 2005).

Quando analisamos do ponto vista psicológico ou comportamental, temos um conceito bem similar ao citado anteriormente. A agressão é um conjunto de comportamentos direcionados a um indivíduo coespecífico, ou não, que tem como objetivo a aquisição de recursos ou a proteção de recursos em risco, como fonte de alimento, fêmeas férteis, locais para a construção de ninhos, proteção da prole e do território. Este conjunto de estratégias comportamentais é compartilhado por diversas espécies preservando seu caráter funcional com algumas características semelhantes. Contudo, a forma de apresentação, de modo geral, varia conforme a espécie e a função (defensiva ou ofensiva). (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003). Parece haver uma correlação entre raiva e agressão em humanos (ARCHER, 2009) e o comportamento agressivo desencadeado por determinadas situações/estímulos em mamíferos não-humanos (ALCOOK, 2013). Justamente por isso, muitos trabalhos têm utilizado modelos animais para estudar a modulação do comportamento agressivo e entender o mesmo em seres humanos (BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003).

1.4. APETITIVO x CONSUMATÓRIO

Quando o indivíduo enfrenta determinadas situações, por exemplo, a invasão de seu território por um coespecífico, pode emitir o comportamento agressivo, essa resposta comportamental exibida pelo animal é dividida em dois componentes lineares e encadeados. O primeiro componente denominado “*apetitivo*” é um conjunto de respostas que aumentam a probabilidade de sucesso do animal (por exemplo, o comportamento agressivo, busca por comida, busca por parceiro reprodutor, etc.). O segundo componente denominado “consumatório” é a finalização do conjunto de respostas que aumentam a probabilidade de sucesso do animal (literalmente atacar/morder, comer, copular) (MCGREGOR; HERBERT, 1992; MOURA et al., 2010). O ato de morder um coespecífico é um comportamento rápido (MICZEK et al., 2001) classificado como *consumatório*, e quando emitido em demasiado, não pode ser analisado como um comportamento agressivo (comportamento funcional), todavia como violência (comportamento disfuncional) (CALCAGNOLI et al., 2013; MICZEK; DE BOER; HALLER, 2013). A mesma interpretação de disfuncionalidade dada para o comportamento violento dos animais é descrita nos conceitos, critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais dos transtornos psiquiátricos no DSM-V. Por isso, podemos entender agressão como uma resposta funcional, selecionada evolutivamente. Entretanto, a violência, excesso de agressão ou agressão emitida fora de contexto deve ser entendida como algo patológico/disfuncional (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; OLIVIER; YOUNG, 2002).

1.5. AGRESSÃO E AVALIAÇÃO DE RISCO

A percepção do ambiente é a primeira etapa para avaliar situações que podem ou não

ameaçar a sobrevivência do organismo (avaliação de risco). Qualquer outro animal que possa interagir de forma não ameaçadora (filhotes e fêmeas) ou ameaçadora (concorrentes coespecífico e predadores) produzirá estímulos visuais, auditivos ou olfativos. No caso de pequenos roedores, essas pistas olfativas, por exemplo, são utilizadas para identificar coespecífico e distinguir odores de predadores; habilidade muito útil em situações que envolvem o confronto “presa-predador” (PELLOW et al., 1985; STAPLES et al., 2008). Além do olfato, os animais se valem da vocalização (GRIMSLEY et al., 2016; MICZEK et al., 1995; WILLIAMS; RISKIN; MOTT, 2008) para a troca de informações. Contudo, essa troca ocorre entre indivíduos coespecíficos (filhotes e fêmeas normalmente).

Quando se depara com um coespecífico competidor, após todas as trocas de informações, o animal pode se colocar na situação de defender seus recursos, se valendo para isto do comportamento agressivo. Para o estudo da agressão em animais se analisa comumente um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas, características de cada espécie, as quais sugerem agressividade. Esses estudos são realizados em um ambiente controlado (normalmente, um laboratório), no qual situações de interação ou confronto podem ser induzidas sem expor o animal a perigo que possa gerar algum dano físico (BRONSTEIN, 1994).

Em adição aos conceitos previamente descritos no texto, a agressão também pode ser considerada como padrões de comportamentos dirigidos a um fim (resposta defensiva ou ofensiva contra um coespecífico ou não) e que auxiliam a comunicação entre as espécies. Desta forma, o comportamento agressivo seria um conjunto de respostas próprias da espécie, com características reconhecível e relativamente estereotipada, desencadeado pela presença de um coespecífico ou não (animais que invadem o território ou ameaçam a posse de algum

recurso).

Considerando a agressividade de forma geral, pode-se observar formas distintas de comportamentos, os quais são peculiares a classes de animais e situações (espécie-específicos) (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 2003; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003). Dentro do subfilo dos vertebrados, podemos ver as diversas formas de emissão de comportamentos agressivos.

Em peixes, o comportamento agressivo do *Betta splendens* (peixe de briga do Sião) é bastante estereotipado e bem visualmente reconhecido, e por isso, muito usado nos estudos de agressão. O animal colocado frente ao estímulo, que pode ser um coespecífico invasor macho ou fêmea (no mesmo aquário ou em aquários separados), um espelho (que mostra seu reflexo) ou um simulacro (que dissimula um coespecífico), passa a emitir o comportamento agressivo, abre suas brânquias e nadadeiras para parecer maior. Pode-se também observar um aumento na intensidade da pigmentação corpórea, e a emissão de vários comportamentos como carga (cabeçadas/ mordidas), nados circulares, etc. (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; EVANS, 1985; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998).

Para cobras e serpentes, a variedade de respostas agressivas envolve posturas com corpos entrelaçados, com a cabeça levemente suspensa do nível do solo, e posicionamento frente a frente com um terço do corpo levantado em posição horizontal ou em alguns casos se aproximando do restante do corpo (menos de 90°) (BOGERT; ROTH, 1956).

Em aves, no exemplo do gênero *Acrocephalus* o comportamento de proteção de ninho apresenta componentes tanto agressivos quanto defensivos, respondendo a diversas variáveis ambientais, como a distância do possível causador de dano, a altura do solo que o ninho se

encontra e a forma de locomoção do predador, terrestre ou alado (KLEINDORFER; FESSL; HOI, 2005).

Considerando os mamíferos, o ataque defensivo pode ser descrito em gatos, por exemplo, como um conjunto de comportamentos que envolvem desde o arqueamento da coluna, a retração das orelhas, a ereção dos pelos, a dilatação das pupilas, a impulsividade, vocalização característica, até o apontar a pata anterior em direção ao estímulo ameaçador realizando movimentos de ataque fronto-lateral (SIEGEL et al., 2007).

Todas as descrições acima são detalhamentos do comportamento emitido por indivíduos interagindo com coespecíficos ou a ameaças de coespecíficos. O paradigma residente-intruso (teste residente-intruso / teste RI) é uma das diferentes abordagens realizadas em laboratório com roedores como modelo animal, para estudar o comportamento agressivo (RAMIREZ, 2000).

Dentre os diversos protocolos para a realização desse teste, o mais usual, é o de agressão induzida pelo isolamento, na qual os animais são colocados em isolamento social, e em seguida, um intruso alojado previamente em grupos sociais (pares/coespecíficos) é introduzido na gaiola/caixa do residente (MICZEK et al., 2001). O isolamento social se faz necessário para que o animal residente assuma o ambiente no qual foi isolado como seu território de tal forma que, quando exposto ao coespecífico invasor, passe a defendê-lo como tal. Outra estratégia para aumentar a territorialidade do animal residente é manter o macho com uma fêmea, e em seguida, separá-los para confrontar com um intruso também alojado previamente em grupo (KOOLHAAS et al., 2013).

Além disso, há diferentes linhagens que apresentam *scores* ou emissões de comportamento agressivo ligeiramente diferentes. Por exemplo, o camundongo selvagem é

mais agressivo (*Mus musculus*) que a linhagem produzida em/para laboratório, e dentro dessas linhagens de laboratório, existem os mais agressivos (C57BL/6) e os menos agressivos (BALB/c) (KOOLHAAS et al., 2013; MICZEK et al., 2001; MICZEK; DE BOER; HALLER, 2013). No presente trabalho, esta diferença foi levada em conta quando da escolha do animal experimental para ser o residente e para ser o intruso.

Além do estresse que a interação com um coespecífico competidor gera, na natureza, os animais podem se encontrar em situações aversivas (ALCOOK, 2013). Essas situações naturalmente geram medo e/ou ansiedade.

1.6. MEDO E ANSIEDADE

Considerando a definição atual de medo, ainda não é clara a diferença existente com relação ao conceito de ansiedade. Em geral, a resposta emitida frente a um perigo incerto é descrita como ansiedade, enquanto que, quando o perigo é real (certo), o estado emocional descrito é medo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Desta forma, o comportamento defensivo desencadeado pelo medo é a resposta comportamental emitida em situações de ameaça à sobrevivência, seja ela, inata ou aprendida, e os comportamentos emitidos pelos animais em situações de ansiedade são respostas de avaliação do ambiente. Ainda, o medo também pode ser descrito como um estado decorrente de um processo punitivo ou que leve o animal a evitar um estímulo aversivo (BRANDÃO, 2004; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010).

As estratégias comportamentais correlacionadas com medo e/ou ansiedade são descritas como congelamento, fuga e luta. Quando o perigo é incerto ou não detectado, o animal emite o comportamento de avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

O comportamento de avaliação de risco é também um comportamento de exploração do ambiente e de extrema relevância adaptativa, pois auxilia a escolha da estratégia defensiva (ou ofensiva) a ser emitida pelo animal na natureza, ou seja, a emissão do congelamento, da fuga ou da luta ou ataque defensivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GROSS; CANTERAS, 2012; SAITO; BRANDÃO, 2015).

Vários estudos foram realizados com a finalidade de avaliar quais as estruturas neurais envolvidas na modulação das respostas comportamentais de defesa, sendo que grande parte dos achados se baseia na técnica da estimulação elétrica de diferentes sítios encefálicos. Hess e Brugger (1943), pioneiros nesta linha de investigação, demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo de gatos, desencadeava um quadro de defesa semelhante àquela provocada pelo confronto com ameaças naturais, como a presença de um cão. Seguindo esta perspectiva, demonstrou-se que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; KINCHESKI et al., 2012) e da amígdala (CANTERAS, 2002; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001; MCGREGOR; HERBERT, 1992) desencadeiam respostas de fuga e luta. Neste último caso, as características do comportamento de defesa emitido são diferentes, havendo um período de latência de vários segundos entre o início da estimulação e o da reação de defesa, bem como persistência desta última depois de cessado o estímulo (BRANDÃO et al., 1999; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; SAITO; BRANDÃO, 2015). Estes resultados indicam que a amígdala é uma estrutura mais relacionada com a modulação do que com a execução da defesa afetiva.

Os comportamentos defensivos desencadeados pelo medo e/ou ansiedade também são modulados pelo hipotálamo, bem como pela atividade do eixo hipotálamo–hipófise–adrenal, circuitarias estas responsáveis pela reação de confronto entre presa-predador, apresentando

aumento imediato do nível de alerta e preparo do organismo para situações de emergência (BENEDETTI et al., 2012; FISH; DEBOLD; MICZEK, 2005; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; GROSS; CANTERAS, 2012).

Da mesma forma que os animais, o homem está ocasionalmente exposto a situações que desencadeiam medo ou ansiedade. Nestas situações, ocorre aumento na quantidade e no fluxo de adrenalina no organismo, dilatação das pupilas para melhorar a capacidade de observação e de análise do ambiente, aumento do tônus muscular e da respiração para preparar para situações adversas, em suma, um conjunto de reações fisiológicas voltadas para a sobrevivência. Entretanto, quando o circuito que modula estas respostas comportamentais defensivas encontra-se alterado, o medo e a ansiedade tornam-se estados patológicos. Desta forma, o uso de fármacos relacionados às respostas emocionais é essencial para que o indivíduo possa realizar suas atividades corriqueiras (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; GROSS; CANTERAS, 2012).

Pesquisas em laboratório que estudam medo ou ansiedade correlacionam testes distintos para desencadear estes dois estados emocionais. Desta forma, é possível que a exposição ao labirinto em cruz elevado ou a exposição ao odor do predador possa desencadear ansiedade, enquanto que a exposição ao predador, tal qual confronto de pequenos roedores à serpente (predador natural) pode ser correlacionado com medo intenso, e pânico ("Rato/Serpentes" - Martinez, Carvalho-Netto, Amaral, Nunes-de-Souza, & Canteras, 2008; "Rato/Gato" - Motta et al., 2009). De fato, pode-se induzir o medo e/ou ansiedade em animais tanto por simulação de condições ecológicas ou ambientais (exposição ao predador e/ou teste do labirinto em cruz elevado), por meio de estimulações elétricas ou químicas de estruturas encefálicas, tal como da substância cinzenta periaquedutal (BLANCHARD et al., 2005;

BRANDÃO et al., 1999; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; SAITO; BRANDÃO, 2015), ou por meio de lesões restritas em determinadas áreas do sistema nervoso central (BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS et al., 1997; MCGREGOR; HERBERT, 1992).

Em particular, camundongos expostos a serpentes, gatos ou a ratos, tanto na natureza quanto em laboratório, apresentam resposta comportamental de defesa correlacionadas com medo intenso (BLANCHARD et al., 2005; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2008; STAPLES et al., 2008; TWARDOWSCHY et al., 2013; URIBE-MARIÑO et al., 2012).

Embora o estudo do substrato neural e da neurotransmissão envolvida na modulação das respostas comportamentais de defesa tenham avançado em grande escala nas últimas décadas (AGUIAR et al., 2005; CANTERAS; MOTA-ORTIZ; MOTTA, 2012; GINSBURG; ALLEE, 2016; GIOVENARDI et al., 2005; GRAEFF, 2007; GROSS; CANTERAS, 2012; KLEINDORFER; FESSL; HOI, 2005; PEAKE; MATOS; MCGREGOR, 2006; SAITO; BRANDÃO, 2015; SOMA, 2006) não há um estudo sistemático da correlação entre os vários experimentos que geram estresse (medo e ansiedade) e a agressividade, ou seja, se situações que desencadeiam medo e/ou ansiedade podem determinar ou alterar a agressividade dos indivíduos.

1.7. AGRESSÃO: RESPOSTAS CONDICIONADAS E INCONDICIONADAS

As respostas comportamentais defensivas podem ser divididas em dois grandes grupos: o grupo das respostas inatas ou incondicionadas, ou reflexas, e o grupo das respostas condicionadas ou aprendidas. Os comportamentos defensivos inatos são respostas frente a ameaças potenciais que não necessitam de qualquer tipo de aprendizagem prévia, tais como o

confronto entre presa-predador, busca por parceiro reprodutor, forrageamento (busca por alimento), etc. Por outro lado, respostas aprendidas, ou condicionadas, relacionam-se a comportamentos desencadeados por estímulos ameaçadores que previamente tenham promovido respostas defensivas ou ativado os circuitos encefálicos de defesa, ou seja, em ambos os casos os animais reagem a situações desencadeadoras de medo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GROSS; CANTERAS, 2012; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007).

1.8. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS INCONDICIONADAS

A necessidade de forragear, de buscar novos territórios e a busca por parceiros reprodutores expõem o animal a situações aversivas (ALCOOK, 2013; ODUM, 1954). Ambientes abertos (simulado no teste campo aberto (CHOLERIS, 2001)) trazem consigo a possibilidade de predação (que está indiretamente associada à exposição ao predador). Com relação aos predadores, para roedores, além de lugares abertos, a toca também pode não ser um lugar 100% seguro, tendo em vista que ratos predam camundongos e ambos são presas de serpentes (ALCOOK, 2013; CAMPOS et al., 2013). Alguns outros ambientes estressantes para roedores envolvem altura, onde os animais, além de estarem expostos a predadores aéreos (ALCOOK, 2013; ODUM, 1954) e predadores terrestres, como serpentes (GUIMARÃES-COSTA et al., 2007; TWARDOWSCHY et al., 2013), também estão expostos a própria a risco de queda (lesão ou até morte).

O teste do campo aberto expõe o animal aos estímulos acima descritos. Em sua estrutura, este teste apresenta uma área central e uma área periférica. Os comportamentos relacionados à ansiedade do animal são definidos pela latência em passar da periferia para o centro do teste, assim como pelo tempo de exposição à área central (CHOLERIS, 2001). Além

disso, a motilidade do animal também pode ser analisada, embora este parâmetro apresente interpretações contraditórias.

O teste do labirinto em cruz elevado também explora a aversão de roedores a ambientes expostos/abertos, mas em escala menor (que o teste campo aberto). Entretanto, explora muito mais a aversão a lugares altos e é muito utilizado como modelo para estudar efeitos farmacológicos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (CAROLA et al., 2002; KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008).

A aversão a predadores é uma das características evolutivas mais bem preservadas entre as diversas espécies. Para avaliá-la, o teste de exposição ao rato (teste de exposição ao predador) trabalha com o pressuposto de avaliação de risco, onde o animal possui uma área segura para explorar e uma área intermediária que se conecta com a área de risco (CAMPOS et al., 2013). Todos esses testes se baseiam em uma resposta incondicionada, ou reflexa, que os animais apresentam quando são expostos a estes estímulos. Entretanto, respostas aprendidas comumente se desenvolvem, sejam estas com base em condicionamento clássico ou instrumental.

1.9. AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS CONDICIONADAS

Sobressalto potencializado pelo medo

Um modelo animal muito utilizado para análise da influência da aprendizagem aversiva sobre a expressão da resposta de medo é o paradigma do sobressalto potencializado pelo medo (SPM), caracterizado por uma resposta defensiva reflexa súbita em consequência da exposição do animal a um estímulo condicionado (como um estímulo luminoso) previamente associado com um estímulo incondicionado (normalmente um choque nas patas).

Esta resposta envolve padrões comportamentais característicos tais como: fechamento dos olhos, contração do pescoço e músculos esqueléticos; sendo provocado por variados tipos de estímulos aversivos, como, por exemplo, um estímulo sonoro de grande amplitude e curto tempo de duração (BROWN; KALISH; FARBER, 1951; KOCH, 1999).

No protocolo experimental de SPM, o som alto que induz o sobressalto é apresentado emparelhado com um estímulo condicionado explícito (luz) ou implícito (contexto) que foi previamente emparelhado com um estímulo aversivo (choque nas patas). Mesmo sem a presença do estímulo aversivo, a amplitude da resposta reflexa é potencializada quando comparada com o sobressalto que foi desencadeado sem a presença do estímulo aversivo (DAVIS, 1986). Este modelo é amplamente utilizado para mensurar respostas comportamentais de medo e ansiedade, sendo capaz de fazer com que o animal emita uma resposta de defesa na ausência do estímulo aversivo.

1.10. VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

A vocalização é um comportamento emitido pelo animal que se expressa pela emissão de uma resposta vocal (sonora) frente a um estímulo específico. Ratos adolescentes e adultos emitem vocalizações ultrassônicas (VUS) diante de uma variedade de encontros sociais (KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 2002) incluindo desafios e treinos comportamentais (luta e treino de predação) que induzem afeto positivo – com VUS induzidas oscilando na faixa de 50 kHz e acima (WILLEY; VARLINSKAYA; SPEAR, 2009), acasalamento (MCGINNIS; VAKULENKO, 2003), e agressão (TAKAHASHI; THOMAS; BARFIELD, 1983; THOMAS; TAKAHASHI; BARFIELD, 1983).

As emissões de VUS são comportamentos que têm sido consideradas como uma

ferramenta (e também indicadores de estresse) que serve a um propósito adaptativo na comunicação social de roedores (BRUDZYNSKI, 2009). Por outro lado, a emissão consistente de vocalizações nas faixas de frequência entre 20 e 30 kHz é frequentemente verificada diante da exposição do animal a estímulos aversivos diversos, incluindo pistas contextuais que discriminam choque nas patas (ANTONIADIS; MCDONALD, 1999), exposição a um predador (BLANCHARD et al., 1991).

Estudos em camundongos são menos extensos, mas sabe-se, que o isolamento social induz VUS em camundongos recém nascidos (*Mus musculus*) (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2001), caindo a zero esta taxa na idade adulta. A expressão de VUS em camundongos adultos tem sido demonstrada em laboratório, apenas dentro de um contexto reprodutivo e principalmente em machos (NYBY, 2001), mas não dentro de um contexto agonístico. Dentro de uma conjuntura aversiva, os poucos trabalhos que utilizaram o modelo do residente-intruso como forma de eliciar VUS foram realizados em fêmeas (LUISA; CRAWLEY; RICCERI, 2009; MOLES et al., 2007; SCATTONI et al., 2008).

1.11. BASES NEUROFARMACOLÓGICAS DA AGRESSÃO

As respostas agressivas (ou defensivas) de roedores a situações ambientais estressoras, correlacionam-se no que diz respeito a neurotransmissão noradrenérgica, serotoninérgica, dopaminérgica e GABAérgica (MICZEK et al., 2002). Dentre todos os neurotransmissores capazes de modificar a agressividade tanto em animais quanto no homem, daremos ênfase ao circuito GABAérgico e dopaminérgico por várias razões.

O neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) é o mais importante neurotransmissor inibitório tônico do sistema nervoso central. Apresenta potente ação

inibitória sobre o sistema que modula as emoções. Dessa forma qualquer redução nos níveis de GABA nesse sistema induz o aparecimento de comportamento agressivo (MANDEL et al., 1981), conforme demonstrado a partir de estudos *post-mortem* com o encéfalo de animais agressivos nos quais foi identificada uma redução acentuada tanto nos níveis de GABA quanto na atividade da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (CLEMENT et al., 1987; EARLEY; LEONARD, 1977; POTEAL et al., 1982; SIMLER; PUGLISI-ALLEGRA; MANDEL, 1982). De qualquer forma, os efeitos do GABA na facilitação do comportamento agressivo parecem estar vinculados ao tipo de área encefálica envolvida, ao tipo de receptor ativado, e ao contexto no qual a agressão é evocada (GRIMES; RICCI; JR, 2003; RICCI et al., 2005; SCHWARTZER; RICCI; JR, 2009; STORK et al., 2000). Como exemplo, a injeção de um antagonista GABAérgico diretamente no septo lateral de ratas com filhotes apresenta um efeito redutor no comportamento agressivo direcionado a machos coespecíficos invasores (GAMMIE; LEE, 2010). Além disso, animais knockout para transportadores de GABA apresentam redução na emissão de comportamentos agressivos (LIU et al., 2007).

Portanto, reiterando o já dito, a ação inibitória do GABA está diretamente relacionada ao local que atua. Se sua ação for em uma região bloqueadora do comportamento agressivo (como por exemplo os Núcleos da rafe) (DE ALMEIDA et al., 2005; NARVAES; DE ALMEIDA, 2014), sua ação vai aumentar esta resposta. Da mesma forma, benzodiazepínicos, inequivocamente conhecidos como substâncias ansiolíticas, apresentam uma ação paradoxal com relação a seu efeito na agressividade (MICZEK et al., 2002). Dos receptores de GABA envolvidos com agressão destaca-se o receptor GABA^A, uma proteína acoplada a um canal iônico. A ativação deste receptor por seu ligante endógeno leva a hiperpolarização celular, em função do influxo de cloro. O envolvimento destes receptores no comportamento agressivo

tem sido demonstrado em diversos experimentos. Entretanto, o tipo de efeito resultante (pró ou antiaversivo) parece depender do tipo de subunidade ativada.

No campo da agressão humana, a classe de drogas mais frequentemente utilizada em intervenções farmacológicas (e a mais profícua) é a dos antagonistas de receptores de dopamina (GUALTIERI; SCHROEDER, 1990; MCDOUGLE et al., 1998). O antagonista de receptores D2 haloperidol é eficaz no controle do comportamento agressivo de pacientes psicóticos (FITZGERALD, 1999; GLAZER; DICKSON, 1998), além de reduzir o comportamento agressivo em pacientes com demência, *borderline* e aqueles que exibem distúrbios de conduta associada a agressão (BEAUCHAINE; GARTNER; HAGEN, 2000; DIEDERICH et al., 2003; KENNEDY et al., 2001).

No campo da pesquisa animal, vários trabalhos têm utilizado um intruso coespecífico como estímulo estressor para avaliar o comportamento agressivo e a neuroquímica envolvida na sua modulação. Fragoso et al. (2016) identificaram uma redução do número de ataques após a administração sistêmica do antipsicótico bloqueador de receptores D2 risperidona (FRAGOSO et al., 2016). Diferente de outros tipos de situações estressoras, quando os animais têm que emitir comportamento agressivo, a liberação de dopamina é significativamente maior, tendo em vista que é uma situação que possivelmente será recorrente (HOLLY; DEBOLD; MICZEK, 2015). A dopamina é uma das aminas biogênicas que estão diretamente relacionadas com o comportamento agressivo e ao sistema de recompensa (ARIAS-CARRIÓN et al., 2010). Miczek & O'Donnell (1978) mostraram que a administração intraperitoneal (i.p.) de cocaína, que age como inibidor da receptação de dopamina, reduz a emissão do comportamento agressivo de ratos submetidos ao teste residente-intruso. Em um trabalho onde foi utilizado drogas agonistas para os dois subtipos de

receptores dopaminérgicos, não foi encontrada diferença da ação redutora no comportamento agressivo dos camundongos isolados (residente) (DE ALMEIDA et al., 2005). Todas estas informações mostram que a expressão do comportamento agressivo pode ser facilitada pelo aumento concomitante de dopamina endógena.

Racional

A agressividade é uma característica dos mamíferos que apresenta um claro valor adaptativo. Esta função adaptativa passa a se tornar não funcional, se a agressividade é intensificada por quaisquer fatores que facilitem sua expressão em contextos não habituais. É possível então que exposição precoce a estressores ambientais intensos facilitem o desenvolvimento de um fenótipo agressivo no futuro. Dentre outras coisas, isto leva à tentativa de entendimento do papel da aprendizagem neste processo. É importante notar que raros são os trabalhos na área da pesquisa básica que tentaram analisar tais questões. Em nosso estudo analisamos se a exposição prévia a estímulos estressores incontroláveis, incondicionados ou aprendidos podem elevar o grau de agressividade de camundongos *Mus musculus* quando testados no modelo de agressividade do residente-intruso. Para isso, diversos estímulos estressores, com diferentes características foram utilizados. Além disso, dado que aumentos no tônus emocional de camundongos podem facilitar a expressão do fenótipo agressivo (NEHRENBURG et al., 2009) utilizamos o registro de vocalizações ultrassônicas como medida de análise das alterações na emocionalidade induzidas pelas variáveis utilizadas. Para responder uma questão secundária, mas não menos importante, analisamos a influência de mecanismos GABAérgicos e dopaminérgicos sobre os níveis de agressividade de camundongos, durante o conflito residente-intruso, induzidos pelas diversas variáveis utilizadas.

2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo investigar se a agressividade de camundongos analisada pelo teste do residente-intruso pode ser alterada através de situações estressoras (que desencadeiam medo e/ou ansiedade). Tendo os estressores divididos em: Estressores ambientais (Ambientes abertos – Campo aberto e Altura – Labirinto em cruz elevado), estressores predatórios (Rato, Odor de rato) e estressores físicos (Choque nas patas; Som & Luz). Neste sentido, o trabalho foi dividido em duas partes experimentais, tendo na primeira parte os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar o efeito da exposição prévia ao campo aberto no comportamento dos camundongos no teste de residente–intruso;
2. Verificar o efeito da exposição prévia ao labirinto em cruz elevado no comportamento dos camundongos no teste de residente–intruso;
3. Verificar o efeito da exposição a odor de um roedor predador (*Rattus norvegicus* – linhagem Wistar) na resposta ao teste de residente–intruso em camundongos;
4. Verificar o efeito da exposição a um predador (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) na resposta ao teste de residente–intruso em camundongos;

Em uma segunda parte experimental, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de drogas no comportamento agressivo de animais submetidos previamente ao estresse de choque nas patas e posteriormente realizado uma bateria de experimentos a fim de avaliar a emissão de vocalização ultrassônica pelos animais após a exposição ao teste residente–intruso. Para esta etapa, os seguintes objetivos específicos foram considerados:

1. Analisar se o tratamento com Diazepam altera a agressividade desencadeada no teste do residente–intruso em camundongos;

2. Analisar se o tratamento com Apomorfina altera a agressividade desencadeada no teste do residente-intruso em camundongos;
3. Analisar se cada tratamento farmacológico modifica a emissão de vocalização ultrassônica dos animais após o teste do residente-intruso em camundongos;
4. Analisar se cada tratamento farmacológico modifica a emissão de sobressalto dos animais após o condicionamento no teste do sobressalto potencializado pelo medo e após o teste residente-intruso em camundongos;

A realização deste conjunto de experimentos permitirá avaliar se há correlação entre a agressividade desencadeada por situações de risco (teste do residente-intruso) e a experiência prévia dos indivíduos ao medo e a ansiedade. Bem como, estes protocolos poderão elucidar se o tratamento farmacológico poderá modificar os padrões comportamentais promovidos pela exposição a situações ameaçadoras.

3. Materiais e Métodos

3.1. Sujeitos

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos adultos jovens BALB/c (*Mus musculus albinus*, heterozigotos e isogênicos, 20 a 30 g, 6/9 semanas, n = 88) e C57BL/6 (*Mus musculus* heterozigotos e isogênicos, 20 a 30 g, 6/9 semanas, n = 88), e rato macho adulto Wistar (*Rattus norvegicus* heterozigotos e isogênicos, 320g, 60 dias, n = 1) fornecidos pelo Biotério Central do *Campus* Administrativo da USP de Ribeirão Preto. Os camundongos foram mantidos em caixas acrílicas forradas com maravalha/serragem (trocas realizadas 3 vezes por semana), em sala climatizada a 24 ± 1 °C, com ciclo de claro/escuro de 12h. (início às 7:00 h), tendo livre acesso à água filtrada e comida (exceto durante os experimentos). Os camundongos experimentais BALB/c (residentes do teste residente-intruso, e que passaram pelos procedimentos experimentais) foram mantidos em caixas individuais (com 540 cm² de piso) para o teste de residente–intruso. Os demais camundongos (C57 – intrusos do teste residente-intruso apenas) foram mantidos em caixas coletivas (com 1354 cm² de piso) com 8~12 indivíduos (ver a seguir em: “Paradigma Residente – Intruso”).

3.2. Ética Animal

A manutenção dos animais e todos os procedimentos experimentais observou às guias internacionais que regulamentam o uso de animais e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA, nº protocolo: 2014.1.383.58.4, data da aprovação 15/07/2014, Biotério “Anexo I” - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto USP), bem como as normas das SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

3.3. Protocolos experimentais

3.3.1. 1ª Parte (Estudo etológico)

Dia 1 ao dia 10 = exposição ao aparato experimental

Dia 11 = exposição ao estímulo estressor*

Dia 12 = Teste Residente – Intruso

Dia 13 = Pós-teste: Exposição ao campo aberto.

*Campo aberto

*Labirinto em cruz elevado

*Exposição ao rato

*Exposição ao odor de rato

3.3.1.1. Aparatos e Procedimentos

O procedimento experimental (**Tabela 1**) consistiu, de forma resumida, em dez apresentações diárias de 300 segundos ao aparato experimental de exposição ao predador. Essas exposições se fazem necessárias para familiarização do grupo que será exposto ao estresse de exposição ao predador e odor do predador, e também, para os demais grupos, a fim de tirar o viés de manipulação. Após estresse segue o teste do *residente – intruso*, finalizando com o teste campo aberto. Todas as manipulações experimentais apresentaram 24 horas de intervalo entre si.

Tabela 1: Esquema apresentando a primeira parte dos experimentos (estudo etológico) mostrando os dez primeiros dias dos experimentos (Familiarização), o decimo primeiro dia (Estresse), o decimo segundo dia (Teste) e o último dia (pos-teste).

Familiarização	Estresse	Teste	Pos-teste
Apresentação ao aparato de Exposição ao predador	Controle	Teste Residente – Intruso	Campo Aberto
Apresentação ao aparato de Exposição ao predador	Campo Aberto	Teste Residente – Intruso	Campo Aberto
Apresentação ao aparato de Exposição ao predador	Labirinto em cruz elevado	Teste Residente – Intruso	Campo Aberto
Apresentação ao aparato de Exposição ao predador	Exposição ao rato	Teste Residente – Intruso	Campo Aberto
Apresentação ao aparato de Exposição ao predador	Exposição ao odor de rato	Teste Residente – Intruso	Campo Aberto

3.3.1.1.1 *Paradigma Residente – Intruso*

Esse confronto tem como objetivo estabelecer hierarquia em uma relação de dominante e submisso através do confronto, onde normalmente o intruso apresenta comportamento de submissão frente ao residente. A utilização de um animal não tão agressivo como residente tem em vista a possibilidade de variação quanto a agressividade (tanto para mais quanto para menos). Por sua vez, se valendo de um animal mais agressivo como intruso, podemos visualizar o nível de agressividade do residente. A escolha de manter o intruso em vida social faz com que ele não veja o residente como intruso, e sim como um novo indivíduo da colônia, e usa o tempo no novo ambiente para exploração. Os animais intrusos (C57 – cepa de animal mais agressivo (J. M. Koolhaas et al., 1980; Nikulina & Kapralova, 1991)) foram pareados de forma aleatória e introduzidos na caixa do residente (BALB/c – cepa de animal com agressividade média) por um período de 5 min onde foram observados os seguintes parâmetros (Jaap M Koolhaas et al., 2013): latência de ataque, *score* ofensivo, levantamento, *score* de exploração social, inatividade. Além disso, os comportamentos: ameaça lateral, postura em pé, agarrar/rolar, manter em baixo e perseguir foram agrupados em uma categoria denominada *Score* ofensivo. Os comportamentos exploração social, cheirar genitálias e limpeza social são agrupados em *Score* de exploração social. A latência de ataque foi quantificada a partir do registro do primeiro ataque (agarrar/rolar) emitido pelo residente, como índice de agressividade.

Para facilitar o entendimento foi traduzido (ou interpretado quando não existe uma tradução adequada para o termo) à descrição etológica dos comportamentos baseado na literatura mais descritiva dos mesmos parâmetros (J. M. Koolhaas et al., 1980; Jaap M Koolhaas et al., 2013):

1 – Latência de ataque: Tempo que o animal leva para iniciar o ataque ao coespecífico. Começa a contar o tempo no momento em que os animais estão na mesma caixa. Caso não ocorra o ataque o tempo de latência é total (300 segundos);

2 – Mover em direção: Redução da distância entre o indivíduo e o coespecífico seguido de contato (6, 9 ou 10), diferente do item 13, onde a exploração do ambiente pode fazer com que os animais se encontrem;

3 – Levantamento: O animal se posiciona nas patas traseiras (assim como no 5) mas sem interação “desarmônica” com o coespecífico e com as patas dianteiras normalmente voltadas para baixo ou apoiadas na parede da caixa;

4 – Ameaça lateral: Lento ou instantâneo ato de expor a lateral do corpo quando se sentir ameaçado ou após a emissão do item 6, corpo rente ao chão, podendo afastar o coespecífico com uma pata (dianteira ou traseira);

5 – Postura em pé: Mesmo comportamento emitido no item 3 só que emitido quando se sente ameaçado ou após a emissão do item 6, com as patas dianteiras apontadas para o coespecífico;

6 – Agarrar/rolar: Movimento muito rápido onde os animais rolam na caixa, (podendo ou não conter “mordidas”, mas pela velocidade que acontece em camundongos, esse item não é contabilizado), que é interrompido quando um indivíduo emite o comportamento descrito no item 6 ou um indivíduo (ou ambos) emite o comportamento descrito no item 5;

7 – Manter em baixo: Ação de se posicionar em cima do coespecífico mantendo uma ou ambas patas dianteiras em contato. Comportamento emitido após o item 6 (ou após o item 5 quando o coespecífico emite o item 4);

8 – Perseguir: Seguir o indivíduo coespecífico/intruso após o item 5~7 seguido de um ou mais dos mesmos itens que antecederem;

9 – Exploração social: Ação de cheirar o corpo do indivíduo coespecífico exceto na região anogenital. (Ação oposta ao item 10);

10 – Cheirar genitálias: Ação de cheirar a região anogenital do indivíduo coespecífico. (Ação oposta ao item 9);

11 – Limpeza social: Emissão do comportamento de limpeza (*Grooming*) no indivíduo coespecífico;

12 – Inatividade: Não se mover, independe da proximidade do coespecífico ou prévio ataque;

13 – Exploração não social (NSE): Explorar o ambiente descartando todos os itens que envolvem a exploração do coespecífico.

3.3.1.1.2. Teste do Campo Aberto

Este teste consistiu da exposição do camundongo ($n = 12$) a uma arena cilíndrica transparente de 300 mm de diâmetro com a base dividido em 12 quadrantes (**Figura 1**). O teste foi realizado à temperatura ambiente, com luzes artificiais, semelhante às condições as quais os camundongos estão familiarizados no biotério de manutenção, tendo a duração de 10 min. Foi observado para análise: 1 – latência de início de locomoção (LIL), 2 – tempo gasto na área central (TC), 3 – tempo gasto na área periférica (TP) e 4 – quantidade de cruzamentos (C). Os camundongos foram colocados no centro do campo aberto no início do teste.

Todos os camundongos foram submetidos a duas exposições ao campo aberto, antes dos distintos testes que desencadeiam medo e/ou ansiedade (labirinto em cruz elevado,

exposição ao odor de rato, exposição direta ao rato) e após o confronto residente-intruso. O objetivo de conjunto de exposição ao campo aberto foi avaliar se há alteração do comportamento devido às situações de confronto que promovem medo e/ou ansiedade.

Figura 1 – Campo aberto para camundongos composto por um cilindro de acrílico transparente (300 mm de diâmetro) com a base branca/opaca dividida em 12 quadrantes. Empresa Bonther. Foram analisados os parâmetros: latência de início de locomoção, tempo gasto na área central, tempo gasto na área periférica e quantidade de cruzamentos. (Bonther, Brasil)

3.3.1.1.3 *Labirinto em Cruz Elevado (LCE)*

O teste do Labirinto em Cruz Elevado (**Fig. 2**) foi inicialmente descrito por Lister (1987), e o aparato consiste de dois braços abertos (15 x 66 cm), unidos ortogonalmente a dois braços fechados (15 x 66 cm) com uma parede de 50 cm, elevados 40 cm do solo por um suporte de madeira. Os camundongos ($n = 12$) foram expostos por um período de 5 min no teste do LCE onde foram analisados os parâmetros: 1 – Número de entradas nos braços abertos, 2 – número de entradas nos braços fechados, 3 – tempo gasto nos braços abertos, 4 – tempo gasto nos braços fechados, 5 – número de defecações e 6 – número de micções (M).

Figura 2 – Labirinto em cruz elevado (LCE) para camundongos de madeira composto por dois braços abertos (15 x 66 cm), unidos ortogonalmente a dois braços fechados (15 x 66 cm), elevados 40 cm do solo. (Bonther, Brasil)

3.3.1.1.4 *Exposição a Rato (ER)*

Com objetivo de desencadear medo inato intenso, foi realizada a exposição direta (**Fig. 3**) do camundongo ($n = 12$) à um rato (*Rattus norvegicus* – linhagem Wistar, $n = 1$), predador natural. O teste teve 10 min no total, sendo 5 min de familiarização e 5 min de experimentação. Foi observado para análise, a emissão dos comportamentos de 1 – avaliação de risco (esticar), 2 – tempo gasto na área segura, 3 – tempo na área de risco, 4 – rastejar, 5 – congelamento e 6 – enterrar (os comportamentos estão descritos na literatura (CAMPOS et al., 2013; YANG et al., 2004)). O aparato utilizado para as exposições a odor e ao predador consiste em uma arena retangular transparente, dividida em um ambiente predador (30 x 30 x 30 cm) e um ambiente da presa (30 x 30 x 30 cm). Em anexo a área da presa existe um túnel cilíndrico (4.4 x 13 cm) que liga a área de risco a área segura (7 x 7 x 12 cm) forrada com maravalha/serragem.

Figura 3: Aparato utilizado para teste de exposição ao predador (odor). Arena retangular transparente (em acrílico) dividida em um ambiente maior para o predador (4) e um ambiente menor para a presa (3). Em anexo a área da presa existe um túnel cilíndrico (2) que liga a área de risco (3) a área segura (1). (A) Esquema meramente ilustrativo; (B) Imagem real. (Bonther, Brasil)

3.3.1.1.5 Exposição a Odor de Rato (EOR)

A exposição a odor de um predador (rato) foi realizada de forma similar à descrita por Staples (2008). Este modelo de exposição consiste na exposição do camundongo ($n = 12$) ao odor de ratos (*Rattus norvegicus*– linhagem Wistar). Os experimentos de exposição foram realizados em um aparato próprio (Fig. 3). Este teste consistiu em um experimento onde o camundongo foi exposto à um pedaço de tecido sintético que foi mantido em contato com o animal (rato) por um período de 15 dias. Esse tecido foi cortado de antemão em diversos pedaços e dispostos no ambiente de acomodação do animal, para entrar em contato com urina, fezes e demais odores peculiares do animal. Doze pedaços simétricos (tamanho, comprimento

e espessura) para não incorrer em diferenças mensuráveis pelos animais experimentais foram separados dentre os obtidos e foram utilizados nos experimentos. O camundongo foi introduzido no aparato experimental de exposição ao predador para exposição ao seu odor, e foi mantido em uma área separado por uma barreira opaca do mesmo material do aparato que foi removida após o período de habituação do animal. O teste teve 10 min no total, sendo 5 min de familiarização e 5 min de experimentação. Foi observado para análise: latência para iniciar o comportamento de 1 – avaliação de risco (esticar), 2 – tempo gasto na área segura, 3 – tempo na área de risco, 4 – rastejar, 5 – congelamento e 6 – enterrar. O tecido sintético foi mantido no mesmo ambiente que o rato utilizado para o experimento de exposição ao predador (rato).

3.3.2. Parte 2 (Estudo farmacológico)

Dia 1 = Choque > Teste Residente – Intruso (RI Basal)

Dia 2 = Choque > Salina fisiológica (s.c.) > Teste Residente – Intruso (RI)

Dia 3 = Choque > Apomorfina (s.c.) + RI

Dia 4 = Choque > Diazepam (s.c.) + RI.

3.3.2.1. Aparatos e Procedimentos

O procedimento experimental consiste (de forma resumida) em exposições de cada grupo a 4 manipulações (4 dias seguidos), onde temos no dia 1, a administração de choque seguida da avaliação do comportamento no teste residente – intruso. Subsequente a isso, administração de choque, seguido de injeção de salina e novamente teste RI. Os dois dias que seguem possuem o mesmo protocolo, só que com a administração das drogas (**Tabela 2**).

Tabela 2: Esquema apresentando a segunda parte dos experimentos (estudo farmacológico) mostrando o grupo que analisado o efeito do choque e grupo que foi quantificada a vocalização ultrassônica associada com o choque.

Experimento	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Controle	Residente - Intruso (RI)	Salina	Apomorfina	Diazepan
Choque	Choque + RI	Choque + Salina + R-I	Choque + Apomorfina + RI	Choque + Diazepan + RI
Choque + Vocalização	Choque + RI	Choque + Salina + R-I	Choque + Apomorfina + RI	Choque + Diazepan + RI

3.3.2.1.1. Choque nas patas (Choque)

A fim de proporcionar uma situação de estresse de forma mais controlado os animais ($n = 8$) foram colocados em um aparato é composto por uma gaiola (7.5 x 8.5 x 7.5 cm) inserida em uma caixa com atenuação de som e acoplada com um sistema interno de vídeo atrelado à um sistema emissor de choque (Insight, São Paulo, Brasil). A gaiola é móvel, feita de acrílico (com a base interna de barras de aço). O experimento de 15 minutos é composto por uma transmissão de 0.4 μ A nas patas dos animais durante 1 segundo com intervalo de 15, 30 e 45 segundos (de forma aleatória para o animal não aprenda nem habitue). A amplitude e amperagem do choque, o tempo e intervalos foram delineados afim de desenvolver o medo condicionado e evitar o processo de desamparo aprendido (situação de estresse intenso e inescapável por tempo indeterminado). O protocolo de choque nas patas é parte do protocolo que foi utilizado posteriormente no teste de sobressalto potencializado pelo medo e é comumente utilizado como estímulo aversivo não intenso (DAVIS et al., 1993; PLAPPERT; PILZ; SCHNITZLER, 1993; WALKER; DAVIS, 1997).

3.3.2.1.2. Sobressalto Potencializado pelo Medo

Para o registro da resposta de sobressalto foram utilizados 4 estabilímetros (16,5 x 7,5 x 7,5cm) sobre os quais foram acopladas quatro caixas de contenção (armação em PVC e grades de ferro 25,5 x 12 x 9cm, Insight, Brasil). Cada aparato era inserido em um aparato de atenuação sonora (64 x 60 x 40cm) com revestimento interno de espuma (Insight, Brasil). As amplitudes de respostas de sobressalto foram registradas através de células de carga contidas na base de cada estabilímetro. A resposta de sobressalto foi captada por sensores e amplificada, gerando um sinal analógico, posteriormente digitalizado para análise em um software específico (Sobressalto, Insight, Brasil). Essa resposta foi registrada dentro de uma janela de 200 ms. O estímulo utilizado consistiu de som de alta intensidade com 3 amplitudes diferentes (ruído branco de 90 x 95 x 105 dB, 50 ms de duração), liberado por um alto falante localizado a 10 cm de distância da gaiola de contenção. As plataformas foram calibradas no início de cada sessão experimental para garantir sensibilidade equivalente ao longo do experimento.

Para a sessão de condicionamento foram utilizadas as mesmas caixas de isolamento acústico, atreladas as caixas usadas no teste de Choque nas patas. As paredes e teto das caixas de isolamento foram compostas de listas horizontais em branco e preto (5cm de largura) para desassociar o condicionamento ao contexto (local). Uma abertura na parede traseira permitiu a apresentação dos estímulos utilizados (luz e som). Os estímulos incondicionados foram administrados por meio de um gerador de choque tipo *scrambler* (insight, Brasil). Quatro câmeras de vídeo instaladas no interior de cada aparato de isolamento acústico permitiu o monitoramento dos animais durante os experimentos. Um estímulo luminoso proveniente de

uma lâmpada de LED (alto brilho, branco 6 W) localizada acima do alto falante, posicionada a frente da caixa de condicionamento, foi utilizada como estímulo condicionado.

Este procedimento foi adaptado para esse estudo, tendo em conta foi realizado apenas uma sessão de experimentos e os animais ($n = 8$) apresentam uma relativa homogeneidade com relação a amplitude de sobressalto.

Para o condicionamento nesse experimento, foram realizadas das sessões com intervalo de 24h, onde os animais foram colocados nas caixas de condicionamento e, após 5 min de habituação, submetidos a 10 associações de luz (estímulo condicionado) x choque nas patas (estímulo incondicionado) com intervalo variado. Cada tentativa consistiu em 4 segundos de luz e 1 segundo de choque. Os choques foram apresentados no último segundo de cada apresentação do estímulo condicionado (luz) e o tempo de duração de cada sessão foi de 40 min.

O teste do sobressalto foi realizado antes (controle) do teste residente - intruso (A) e depois do teste residente intruso (Salina, Diazepam e Apomorfina) e sem a exposição ao teste residente-intruso (B) (ver a seguir, Resultado - **Figura 13**).

3.3.2.1.3. Vocalização ultrassônica (USV)

Um segundo grupo exposto ao mesmo protocolo de choque nas patas (item 3.3.2.1.1.) foi montado e após isso, um teste para quantificar a emissão de vocalização ultrassônica (USV) foi realizado em uma caixa experimental desenvolvida para avaliar a emissão de vocalização ultrassônica, que foi previamente descrito de forma detalhada em trabalhos anteriores (BASSI et al., 2007; NOBRE; BRANDAO, 2004; NUNES MAMEDE ROSA et al., 2005). De forma resumida, é um aparato com vedação acústica contendo microfones especiais

(Ultra Sound Advice, Londres, Reino Unido) e uma câmera para filmar o animal experimental. O animal ($n = 8$) foi inserido em uma caixa ($25 \times 15 \times 12$ cm) feita de barras de metal com um espaçamento de aproximadamente 12 mm (entre as barras). Os parâmetros analisados foram: emissão de vocalização (>20 kHz) e duração total de emissões. Esses parâmetros são analisados por um sonograma (Ultravox signal analysis work station, Noldus Instruments, Amsterdã, Holanda), armazenado no computador e transferido posteriormente para tabelas (Excel; Microsoft Corp., Mountain View, Califórnia, Estados Unidos da América) e posterior análise estatística. A escolha da frequência utilizada para a quantificação da emissão da vocalização dos animais foi baseada em prévios experimentos que mostram que a exposição de roedores a situações aversivas produz uma vocalização variando de 22 a 24 KHz (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003; NUNES MAMEDE ROSA et al., 2005). Os microfones responsáveis pela captação da emissão sonora dos animais foram previamente (antes do início dos experimentos) calibrados com auxílio de um gerador de áudio (GW, 1 MHz, Nova Jersey, Estados Unidos da América). O procedimento experimental consiste em estabelecer uma linha de base ao inserir a caixa contendo o animal por um período de 300 segundos para que o animal se habitue ao ambiente, seguido de uma medição de 300 segundos após a manipulação experimental. No momento do experimento o animal é exposto ao teste Residente-Intruso dentro e assim que o intruso for retirado, a USV é quantificada.

3.3.2.1.4. Drogas utilizadas

Após a análise dos resultados dos testes comportamentais, foram realizados tratamentos farmacológicos para avaliar suas ações na modulação do medo e/ou ansiedade associados a agressividade. Para isto foram utilizados Diazepam (benzodiazepínico, agonista

GABAérgico, 0,5 mg/kg/ml, subcutânea [s.c.], Sigma-Aldrich – Estados Unidos da América) e Apomorfina (agonista de receptor relativamente não-seletivo para a dopamina; 2.5 mg/kg/ml, s.c. Sigma-Aldrich – Estados Unidos da América). As doses utilizadas foram fundamentadas em estudos prévios (NIKULINA; KAPRALOVA, 1991; OLIVIER; MOS; MICZEK, 1991). Todos os fármacos foram diluídos em solução salina 0,9 % estéril. A administração foi aguda (s.c.), 15 minutos antes da exposição aos testes residente intruso (n = 8).

3.4. Eutanásia

Os animais não experimentais utilizados na primeira parte dos experimentos foram contidos manualmente e então administrado uma associação de cloridrato de cetamina 10% (125mg/Kg) e xilasina 2% (15 mg/Kg). A cessação das funções vitais do animal foi comprovada pela ausência de respiração, batimento cardíaco e reflexo muscular (procedimento avaliado pelo CEUA, nº protocolo: 2014.1.383.58.4, data da aprovação 15/07/2014). A partir da segunda parte dos experimentos, todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de administração de sobredose de benzodiazepínico (Diazepam) e posteriormente sujeitos a exposição à Dióxido de carbono (CO²) por um período não inferior a 45 min, para a cessação das funções vitais do animal constatado pela ausência de respiração, batimento cardíaco e reflexo muscular.

3.5. Análise estatística

Parte 1: Os dados são apresentados pela média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos a partir do experimento campo aberto foram analisados através do teste Mann-Whitney U. Os

demais experimentos foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal–Wallis (ANOVA One-Way). A diferença entre os grupos foi apresentada pelo post-hoc X^2 (intervalo de confiança $p < 0.05$).

Parte 2: Devido à natureza do delineamento experimental (sujeito sobre seu próprio controle), os dados foram submetidos a análise de One-Way ANOVA de Medidas Repetidas. O post-hoc Newman-Keuls para múltiplas comparações apresentou diferença entre grupos com um nível de significância de $p < 0.05$.

4. Resultados

De forma resumida, os resultados obtidos na primeira parte desse estudo mostram que a pré-exposição a situações aversivas que desencadeiam medo ou ansiedade (campo aberto, labirinto em cruz elevado, exposição ao rato e exposição ao odor de rato) altera os comportamentos avaliados no teste residente-intruso. No entanto, a latência de ataque (medida de agressividade) não se modificou em todos os grupos experimentais (**Fig. 4, Tabela 3**). Além disso, a exposição direta a um predador (ER) modifica o número de cruzamentos no teste de campo aberto, independentemente da exposição ou não ao teste RI (**Fig. 5**). Já na segunda parte dos experimentos podemos ver que a administração de Diazepan reduz o tempo da latência de ataque enquanto que aumenta o tempo despendido pelo animal atacando (Agarrar) o co-específico intruso. E a administração de Apomorfina aumenta o tempo do animal em Inatividade.

1ª Parte

Efeito da pré-exposição a estímulos aversivos inatos sobre o comportamento agressivo de camundongos

A ANOVA One-Way aplicada aos resultados do teste RI da primeira parte dos experimentos revelou diferença significativa nos comportamentos: mover em direção ($F_{4,32} = 10,30$, $p < 0,0001$), *Score* de exploração social ($F_{4,32} = 217,4$, $p < 0,0001$), *Score* de exploração não social ($F_{4,32} = 178,0$; $p < 0,0001$). O post-hoc Newman-Keuls indicou que o grupo que foi submetido ao teste de Exposição ao Rato reduziu o comportamento de mover em direção e exploração social quando comparado aos outros grupos ($p < 0,05$, **Fig. 4**). Em contraste, no grupo submetido anteriormente ao campo aberto, observou-se um aumento no comportamento de exploração social em relação a todos os outros grupos ($p < 0,0001$, Newman-Keuls, **Fig. 4**). Com relação ao *Score* de exploração não-social, os grupos expostos ao campo aberto, labirinto em cruz elevado, exposição ao rato e exposição ao odor de rato,

reduziram a duração do tempo de exploração não-social (**Fig. 4**) quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$, Newman-Keuls). Novamente, a exploração não-social no grupo campo aberto foi diferente em comparação com labirinto em cruz elevado, exposição ao rato e exposição ao odor de rato ($p < 0,0001$, Newman-Keuls, **Fig. 4**). Finalmente, a ANOVA One-Way aplicada no parâmetro *Score* ofensivo mostrou que não houve diferença entre todos os grupos (**Fig. 4**). Para analisar se a exposição a um intruso coespecífico alteraria o comportamento exploratório natural ou locomotor, os grupos independentes foram submetidos apenas a estímulos aversivos sem a realização do teste RI. A ANOVA One-way aplicada no número de cruzamentos revelou diferença considerando os estímulos aversivos ($F_{4,47} = 3,904$; $p = 0,008$). O post-hoc Newman-Keuls mostrou que o número de cruzamentos nos grupos previamente submetidos à exposição direta a um predador (ER) aumentou quando comparado aos grupos controle e EOR (**Fig. 5A**). Contudo, os grupos controle, campo aberto labirinto em cruz elevado e exposição ao odor de rato não diferiram entre si (**Fig. 5A**). Além disso, o tempo gasto na área central e na área periférica durante o teste do campo aberto, 24 horas após o teste RI, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em todos os grupos (**Fig. 5B**). Com relação ao comportamento defensivo do intruso (**Tabela 3**), os presentes resultados não mostram alteração no comportamento de defesa, agarrar, exploração social e exploração não-social.

Tabela 3: Média $\pm$ Desvio padrão da emissão do comportamento agressivo analisado no teste Residente – Intruso. Categorias comportamentais relacionadas com o intruso (porcentagem do tempo de observação (300 seg), seguidas do tempo da latência de ataque do residente (em segundos)).

Grupo	n	Comportamento Defensivo	Agarrar	Exploração Social	Exploração Não-Social	Latência Ataque
Controle	4	0.0 $\pm$ 0.0	4	0.0 $\pm$ 0.1	4	300.0 $\pm$ 0.0
OF	8	2.1 $\pm$ 1.1	8	2.1 $\pm$ 1.2	8	300.0 $\pm$ 0.0
EPM	7	4.5 $\pm$ 1.2	7	4.5 $\pm$ 1.3	7	266.4 $\pm$ 15.8
ER	8	1.2 $\pm$ 0.6	8	1.2 $\pm$ 0.7	8	300.0 $\pm$ 0.0
EOR	6	0.9 $\pm$ 0.4	6	0.9 $\pm$ 0.5	6	260.0 $\pm$ 40.0

Figura 4: Gráfico representativo do efeito da pré-exposição a situações estressoras (campo aberto – OF; labirinto em cruz elevado – EPM; exposição ao rato – ER; exposição ao odor de rato – EOR) ou não (Controle) no comportamento agressivo avaliado a partir do teste Residente – Intruso (n = 4-8 por grupo). * $p < 0.05$, Pos-hoc Newman-Keuls com grupo Controle, # $p < 0.05$, Pos-hoc Newman-Keuls entre grupos.

Figura 5: Gráfico apresentando dados da avaliação da locomoção no teste campo aberto. (A) Numero de cruzamentos (contagem/soma) 24 horas antes (Sem RI) e 24 horas depois (Com RI) da execução do teste Residente – Intruso (RI) para os grupos expostos a estressores (campo aberto, labirinto em cruz elevado, exposição ao rato e exposição ao odor de rato) e o grupo sem exposição a estressores (Controle). (B) Tempo gasto na Área Central e na Área Periférica no teste campo aberto 24 horas após o teste Residente – Intruso (n = 4-8 por grupo). *p < 0.05, Pos-hoc Newman-Keuls comparado com os demais grupos.

2ª Parte

Condicionamento ao Choque

Devido à natureza do delineamento experimental (sujeito como seu próprio controle), foi usado uma ANOVA One-Way para medidas repetidas. Na segunda parte dos experimentos, a aplicação dessa análise nos resultados obtidos a partir do teste RI após a exposição a choque nas patas temos diferença significativa em: Latência de ataque ($F_{7,55} = 23,01$; $p < 0,0001$), Levantamento ($F_{7,55} = 6,906$; $p < 0,0001$), *Score* ofensivo ($F_{7,55} = 17,15$; $p < 0,0001$), *Score* de exploração social ($F_{7,55} = 3,849$; $p = 0,0026$) e Inatividade ($F_{7,55} = 190,2$; $p < 0,0001$) e com relação a análise individual de cada variável com o seu respectivo controle (sem o choque), não houve diferença estatística significativa.. O post-hoc Newman-Keuls indicou o efeito do Diazepam na redução da Latência de ataque ($p = 0,0162$) (**Fig. 7A**) e Inatividade ($p < 0,0001$) (**Fig. 8A**), já no parâmetro *Score* ofensivo ($p = 0,0002$) houve um aumento (**Fig. 6**). Com relação à análise feita a partir dos dados de Apomorfina, o único componente que sofreu aumento foi a Inatividade ($p < 0,0001$) (**Fig. 8A**) enquanto que nos componentes Levantamento ($p = 0,0248$) (**Fig. 7B**) e exploração social ($p < 0,0001$) (**Fig. 8B**) houve uma redução. Utilizando o mesmo protocolo, entretanto para posteriormente quantificar a vocalização dos animais, também apresentaram diferença estatística os parâmetros: Latência de ataque ($F_{7,55} = 21,91$; $p < 0,0001$), Levantamento ($F_{7,55} = 4,992$; $p = 0,0061$), *Score* ofensivo ($F_{7,55} = 48,88$; $p < 0,0001$), *Score* de exploração social ($F_{7,55} = 16,40$; $p < 0,0001$) e Inatividade ($F_{7,55} = 198,9$; $p < 0,0001$). O post-hoc Newman-Keuls mostrou que sobre o efeito do Apomorfina, houve uma redução nos parâmetros: Levantamento ($p = 0,0061$) e *Score* de exploração social ($p < 0,0001$). E com relação ao item Inatividade ($p < 0,0001$), assim como no experimento anterior, houve um aumento significativo. Com relação a

administração de Diazepam, houve uma redução apenas no componente Latência de ataque ($p < 0.0001$), enquanto que nos itens: *Score* ofensivo ($p < 0.0001$) e *Score* de exploração social ($p < 0.0001$) houve um aumento.

Figura 6: Gráfico representativo do efeito da pré-exposição a situações estressantes (condicionamento ao choque) no parâmetro *Score* ofensivo avaliado no teste Residente – Intruso ($n = 8$ por grupo) em associação com tratamento. * $p < 0.0001$, Post-hoc Newman-Keuls mostra aumento quando comparado com o basal.

Figura 7: Gráfico representativo do efeito da pré-exposição a situação estressante (condicionamento ao choque) nos parâmetros (A) Latência de ataque ($p < 0.0001$) e (B) Levantamentos ($p = 0.0248$) avaliados no teste Residente – Intruso ($n = 8$ por grupo) em associação com tratamento. # $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou uma redução quando comparado com o basal.

Figura 8: Gráfico representativo do efeito da pré-exposição a situações estressantes (condicionamento ao choque) nos parâmetros de (A) Inatividade ($p < 0.0001$) e (B) *Score* de exploração social ($p < 0.0001$) avaliado no teste Residente – Intruso ($n = 8$ por grupo) em associação com o tratamento. * $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou um aumento em comparação com o basal. # $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou uma redução quando comparado com o basal.

Figura 9: Gráfico representativo do efeito nos parâmetros avaliados no teste Residente – Intruso (vocalização ultrassônica) na pré-exposição a situações estressantes (condicionamento ao choque) relacionado com o *Score* ofensivo ($p < 0.0001$) em associação com o tratamento ($n = 8$ por grupo). * $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou um aumento quando comparado com o basal.

Condicionamento ao Choque + Registro da Vocalização Ultrassônica

Usando o mesmo protocolo, para posteriormente analisar e quantificar a vocalização ultrassônica dos animais, os parâmetros comportamentais também apresentaram diferença estatística significativa: Latência de ataque ($F_{7,63} = 25,64$; $p < 0,0001$), Levantamento ($F_{7,63} = 7,302$; $p < 0,0001$), *Score* ofensivo ($F_{7,63} = 44,98$; $p < 0,0001$), *Score* de exploração social ($F_{7,63} = 19,89$; $p < 0,0001$) e Inatividade ($F_{7,63} = 209,1$; $p < 0,0001$). Com relação a análise individual de cada variável com o seu respectivo controle (sem o choque), assim como no experimento anterior, não houve diferença estatística significativa. O post-hoc Newman-Keuls indicou o efeito da Apomorfina na redução dos parâmetros Levantamento ($p = 0,0012$) (**Fig. 10B**) e *Score* de exploração social ($p < 0,0001$) (**Fig. 11B**). Com relação ao item Inatividade ($p < 0,0001$) (**Fig. 11A**), também como no experimento anterior, houve um aumento significativo. Quanto aos efeitos do Diazepam, houve redução somente na Latência de Ataque ($p < 0,0001$) (**Fig. 10A**), enquanto que nos itens: *Score* ofensivo ($p < 0,0001$) (**Fig. 9**) e Exploração Social ($p < 0,0001$), um aumento (**Fig. 11B**). Em relação à USV, One-Way ANOVA para medidas repetidas apresentou diferença nos parâmetros Número de eventos ($F_{4,39} = 14,61$; $P < 0,0001$) (**Fig. 12A**) e Duração total ($F_{4,39} = 8,569$; $P < 0,0001$) (**Fig. 12B**). O teste post hoc Newman-Keuls indicou uma redução no número de eventos de vocalização e na duração total da vocalização sob a influência da Apomorfina ($p < 0,0001$) (**Fig. 9**) e a administração de Diazepam aumentou a emissão de vocalização (Número de Eventos) com relação ao Basal – A. O post- hoc mostrou também que os parâmetros Basal – B, Salina e Diazepam apresentaram diferença estatística quando comparado com seus respectivos controles ($p < 0,0001$) (**Fig. 9B**) com relação ao número de eventos e com relação

a Duração Total, apenas os parâmetros Salina e Diazepam apresentaram diferença estatística quando comparados com seus controles.

Figura 10: Gráfico representativo do efeito no teste Residente – Intruso (vocalização ultrassônica) na pré-exposição a situação estressante (condicionamento ao choque) nos parâmetros (A) Latência de ataque ($p < 0.0001$) e (B) Levantamento ($p = 0.0012$) em associação com tratamento ($n = 8$ por grupo). # $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou uma redução quando comparado com o basal.

Figura 11: Gráfico representativo do efeito no teste Residente – Intruso (vocalização ultrassônica) na pré-exposição a situações estressantes (condicionamento ao choque) nos parâmetros de (A) Inatividade ($p < 0.0001$) e (B) *Score* de exploração social ($p < 0.0001$) em associação com o tratamento ($n = 8$ por grupo). * $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou um aumento em comparação com o basal. # $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou uma redução quando comparado com o basal.

Figura 12: Gráfico representativo do efeito na avaliação da Vocalização ultrassônica após exposição a situação estressante (condicionamento ao choque) nos parâmetros (A) Número de eventos ($p < 0.0001$) e (B) Duração total, componentes avaliados após o teste Residente – Intruso ($n = 8$ por grupo) em associação com o tratamento. * $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls apreentou um aumento em comparação com o basal. # $p < 0.0001$, Pos-hoc Newman-Keuls mostrou uma redução quando comparado com o basal.

Sobressalto Potencializado pelo Medo: Devido à natureza do experimento e do delineamento experimental (sujeito como seu próprio controle), foi usado uma ANOVA One-Way para medidas repetidas. Usando o protocolo descrito no método, e analisando o parâmetro comportamental: Amplitude ($F_{7,63} = 46,62$), o post-hoc Newman-Keuls mostrou um aumento na emissão desse parâmetro sobre efeito da administração de Diazepam ($p < 0,05$) no grupo que não foi exposto ao teste residente –intruso (**Fig. 13**).

Figura 13: Gráfico representativo do efeito da administração de drogas (Diazepam e Apomorfina) no teste do sobressalto potencializado pelo medo, antes (controle) e depois da exposição ao teste Residente – Intruso (A) ou não (B) no componente comportamental Amplitude ($n = 8$ por grupo) * $p < 0.05$, Pos-hoc Newman-Keuls apresentou um aumento em comparação com o grupo que passou pelo teste Residente – Intruso.

5. Discussão

Como já apresentamos dentro do subfilo dos vertebrados, podemos ver as formas mais diversas de emissão de comportamentos agressivos. Nos peixes, por exemplo, o comportamento agressivo dos *Betta splendens* (Peixe de Briga do Sião) é bastante estereotipado e bem reconhecido visualmente. Essa é a razão pela qual é tão usado em estudos de agressão (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; EVANS, 1985; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998). Nos répteis, as cobras possuem a variedade de respostas agressivas envolvendo posturas com corpos entrelaçados, cabeça ligeiramente suspensa do nível do solo e posicionamento face a face com um terço do corpo levantado horizontalmente (menos de 90 °) (BOGERT; ROTH, 1956). Em relação aos mamíferos, o ataque defensivo foi descrito em gatos como um conjunto de comportamentos envolvendo arqueamento para trás da coluna vertebral, retração das orelhas, piloerção, dilatação da pupila, impulsividade, vocalização auditiva ou ultrassônica, apontando a pata anterior em direção ao estímulo ameaçador e o desempenho de movimentos de ataque fronto-lateral (SIEGEL et al., 2007). Todos esses repertórios comportamentais defensivos podem ser divididos em dois grandes grupos: respostas inatas ou incondicionais e condicionadas ou aprendidas. Os comportamentos defensivos inatos são respostas a ameaças potenciais que não requerem qualquer aprendizagem prévia, como o confronto entre presas e predadores.

Por outro lado, as respostas aprendidas ou condicionadas estão relacionadas a comportamentos desencadeados por estímulos ameaçadores que anteriormente provocaram respostas defensivas ou ativaram os circuitos de defesa do cérebro. Em ambos os casos, os animais reagem às situações provocadoras do medo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GROSS; CANTERAS, 2012; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007). Em nosso estudo, estávamos interessados em entender se a experiência anterior com vários estímulos

estressantes diferentes poderia alterar o comportamento agressivo de camundongos emitido a um intruso usando o teste RI. Além disso, investigamos os efeitos da modulação sistêmica da neurotransmissão de GABA e dopamina nesta resposta e também os efeitos do estresse e dos tratamentos medicamentosos sobre a emotividade dos camundongos.

Trabalhos anteriores sugerem que as experiências dia-a-dia podem ser um gatilho para uma regulação positiva no comportamento agressivo em seres humanos. Em nosso estudo, os presentes resultados mostraram que situações aversivas distintas podem produzir efeitos diferentes no comportamento agressivo avaliado no teste residente-intruso. Particularmente, a previa exposição a um predador reduz em grande parte os comportamentos de mover em direção, exploração social e não-social. Além disso, outras situações aversivas que são comumente conhecidas por desencadear o comportamento semelhante à ansiedade, como teste de campo aberto, teste do labirinto em cruz elevado e exposição ao odor predador também diminuíram o comportamento de exploração não-social. É importante notar que a exposição direta a um predador promoveu um aumento no número de cruzamentos no teste de campo aberto que pode indicar uma modificação na locomoção. O tempo gasto nas áreas central e periférico do teste de campo aberto realizado após o teste RI não apresentou diferença em nenhum dos grupos experimentais pré-expostos a diferentes situações aversivas.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os achados prévios que sugeriram que a situação aversiva pode modificar os parâmetros comportamentais associados ao medo e à ansiedade de maneira diferente. Em particular, é possível formular a hipótese de que o medo e/ou ansiedade produzidos por exposição a espaços abertos (teste do campo aberto) promoveu um aumento no tempo e na energia gastos seguidos e avaliação do novo item do ambiente (a presença do intruso), resultando em ambos os comportamentos mover em direção e exploração

social, parâmetros opostos quando relacionados com os parâmetros/componentes do comportamento agressivo. Em contraste, nossos resultados mostraram que a exposição a um predador (ratos) diminuiu os mesmos parâmetros de comportamento (mover em direção e exploração social), o que pode sugerir que a presença de um predador faz a interação com o coespecífico ficar no segundo plano ou não tão relevante para o momento. Por outro lado, a exposição a um predador promoveu um aumento no número de cruzamentos no teste de campo aberto, independentemente da exposição ao teste RI, o que pode sugerir um aumento na atividade de locomoção quando a ameaça (predador) ainda não foi identificada.

Como evidência adicional de modulação do comportamento agressivo, situações estressantes tais como, espaços abertos (teste de campo aberto) (CHOLERIS, 2001), altura (teste do labirinto em cruz elevado) (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008) e risco de predador (exposição ao predador) (CAMPOS et al., 2013; CANTERAS et al., 1997) produzem uma redução do parâmetro de exploração não-social avaliado no teste RI. Este efeito pode estar relacionado com um aumento dos comportamentos de avaliação de risco e proteção territorial à procura de potenciais ameaças. A exploração do ambiente é um comportamento natural emitido por roedores, que foi associado com reforço motivacional positivo e quando este comportamento é comprometido pode sugerido uma modulação nos mecanismos emocionais ou motivacionais (LEUSSIS; BOLIVAR, 2006; VAN KAMPEN, 2015).

A modulação negativa nos parâmetros agressivos, como o score agressivo (DE BOER et al., 1999; KOOLHAAS et al., 2013) ou a modulação positiva no número de ataques (mordidas) (FISH et al., 2008; FRAGOSO et al., 2016) durante o teste RI, podem ser considerados exemplos de modulações que afetam, especificamente, os parâmetros agressivos. Entretanto, o paradigma do RI compreende outras classes de medidas e de resultados que

incluem a exploração social e não-social, que estão relacionadas com a investigação de oponentes e exploração do ambiente (respectivamente) (DE BOER et al., 1999). Desta forma, os resultados mostraram que a pre-exposição a situações aversivas reduziu a exploração social e não social, o que pode sugerir que experiências anteriores de medo ou ansiedade promoveram uma modulação no comportamento de avaliação de risco. Como não temos uma redução direta na agressividade, mas uma mudança em outros parâmetros comportamentais, podemos inferir que a exposição a situações que causam medo ou ansiedade tem um efeito indireto na modulação do comportamento agressivo, fazendo com que o animal gaste mais tempo e esforço para avaliar o ambiente e o coespecífico em vez de realmente atacar o invasor.

Em relação ao substrato neural responsável pelo comportamento emocional, as situações estressantes e ameaçadoras promovem uma ativação em diversas áreas do cérebro, dentre elas a região dorsal do núcleo mamilar (MARTINEZ et al., 2008), o hipotálamo mediano (CANTERAS, 2002), Núcleo hipotalâmico anterior (CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001), parte dorsomedial do núcleo ventromedial (MOTTA et al., 2013). Estas estruturas juntamente com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal estão intimamente relacionadas e ligadas através do septo lateral (GAMMIE et al., 2009) com amígdala (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988) e hipocampo (DE BOER et al., 1999), diretamente relacionado à modulação do comportamento agressivo. Além disso, em uma situação natural, quando o animal tem que lutar para defender/adquirir recursos (competição), a corticosterona liberada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal promove uma inibição nos mecanismos de serotonina e um aumento na neurotransmissão de GABA potencializando o comportamento

agressivo (ABRAHAMS; ROBB; HARE, 2005; PARMIGIANI; FRANCESCO FERRARI; PALANZA, 1998; ROSELL; SIEVER, 2015).

Circuitos neurais relacionados ao medo e à ansiedade podem agir de forma moduladora de áreas como a amígdala e o septo lateral, potencializando o estresse gerado por uma exposição a estímulos aversivos (campo aberto, labirinto em cruz elevado, predador e odor de predador), o que resulta em uma diminuição na intensidade com que o animal defende seu território, sugerindo que aquele ambiente não é mais totalmente seguro (BLANCHARD et al., 2005; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001).

Ao contrário de nossos achados, o estudo de Nikulina e Kapralova (1991) mostrou que a administração aguda de apomorfina aumenta a agressividade de camundongos da linhagem BALB/c expostos a situações estressantes (choque nas patas). No entanto, assim como eles identificaram diferentes cepas apresentando diferentes respostas ao mesmo medicamento/dose, talvez a idade também seja um item a ser considerado para análise. A redução da latência de ataque e o tempo de inatividade, bem como o aumento do *score* ofensivo são dados que mostram o efeito modulador positivo do diazepam na agressividade dos animais, dados que corroboram os achados de vários pesquisadores. As situações estressantes têm a capacidade de modular o comportamento animal e, quando avaliadas a partir da vocalização ultrassônica, essas situações estressantes aumentam drasticamente o número de emissões e o tempo total de emissão emitido pelo animal. A apomorfina conseguiu bloquear a influência de choques nos pés na vocalização ultrassônica, reduzindo a taxa para níveis basais, enquanto a administração aguda de diazepam não teve efeito, permanecendo similar à administração salina.

Nossos dados mostram que o efeito de uma situação estressante e possivelmente danosa ao indivíduo como a exposição a um coespecífico (teste residente-intruso) associada a outros eventos estressantes (choque nas patas) sobre efeito de um benzodiazepínico, agonista GABAérgico (Diazepam) potencializa a emissão de respostas no experimento de sobressalto potencializado pelo medo. Apesar dos demais dados adquiridos a partir desse experimento divergirem da literatura, uma interpretação pode se dar pelo uso de animais diferentes, com idades diferentes, tendo em vista que trabalhos anteriores mostram diferença no comportamento de ratos machos e fêmeas (em ciclos diferentes) (ARMBRUSTER et al., 2014; BTASZCZYK; TAJCHERT, 1996; KOFLER et al., 2001).

Com relação ao efeito de estímulos estressores (choque nas patas) e sua ação nos experimentos, talvez o tempo do protocolo e/ou a intensidade do estímulo poderiam ser revistas para alcançar um efeito mais robusto.

Em conclusão, os dados atuais podem indicar que situações estressantes anteriores que desencadeiam medo ou ansiedade podem modular as medidas de resultado avaliadas no teste RI de maneira diferente. Assim, a exposição a espaços abertos (teste de campo aberto), que pode ser relacionada ao comportamento de avaliação de risco, aumento do movimento para o comportamento e exploração social e reduz a exploração não social, o que pode sugerir um aumento nas análises ambientais (relacionadas a um aumento na interação coespecífica). Por outro lado, a experiência de medo anterior, como a exposição dos predadores e odor de predadores, promoveu uma redução na interação coespecífica, que foi indicada para uma diminuição da exposição social (somente a exposição do rato) e não social e no comportamento de movimentar em direção, particularmente após a presença de um predador. Além disso, a exposição direta a um predador melhorou o comportamento de locomoção

evidenciado pelo aumento do número de cruzamentos no teste OF, independentemente de enfrentar um intruso.

Ideias Futuras

Utilizar um campo aberto com toca para avaliar a locomoção quando o animal tem a possibilidade de se esconder e fugir do estímulo aversivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMMS, M. V.; ROBB, T. L.; HARE, J. F. Effect of hypoxia on opercular displays: Evidence for an honest signal? **Animal Behaviour**, v. 70, n. 2, p. 427–432, 2005.
- AGUIAR, L. M. et al. Tentativa de infanticídio por um macho dominante de *Alouatta caraya* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em um infante extra-grupo devido a influência do observador. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1201–1203, 2005.
- ALCOOK, J. **Animal Behavior: An Evolutionary Approach**. 10th Editi ed. [s.l: s.n.].
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. **Manual Diagnóstico e Estatístico De Transtornos Mentais - DSM-5**. [s.l: s.n.].
- ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. v. 101, p. 1–13, 1999.
- ARCHER, J. The nature of human aggression. **International Journal of Law and Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 202–208, 2009.
- ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 1, p. 24, 2010.
- ARMBRUSTER, D. et al. The impact of sex and menstrual cycle on the acoustic startle response. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 326–333, 2014.
- BANNAI, M. et al. Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 2, p. 295–304, 2007.
- BASSI, G. S. et al. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 365–74, dez. 2007.
- BEAUCHAINE, T. P.; GARTNER, J.; HAGEN, B. Comorbid Depression and Heart Rate

Variability as Predictors of Aggressive and Hyperactive Symptom Responsiveness During Inpatient Treatment of Conduct-Disordered , ADHD Boys. v. 26, n. May 1999, p. 425–441, 2000.

BENEDETTI, M. et al. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. **European journal of pain (London, England)**, v. 16, n. 6, p. 803–15, 2012.

BLANCHARD, D. C. et al. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1243–1253, 2005.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, p. 43–68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. What can animal aggression research tell us about human aggression? **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 3, p. 171–177, 2003.

BLANCHARD, R. J. et al. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 5, p. 967–972, nov. 1991.

BLANCHARD, R. J.; WALL, P. M.; BLANCHARD, D. C. Problems in the study of rodent aggression. **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 3, p. 161–170, 2003.

BOGERT, C. M.; ROTH, V. D. Ritualistic combat of male Gopher Snakes, *pituophis melanoleucus affinis* (reptilia, Colubridae). n. 1963, p. 1–28, 1956.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents : a tool for assessment of neurobehavioural development. v. 125, p. 49–56, 2001.

BRANDÃO, M. L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 6, p. 863–875, 1999.

BRANDÃO, M. L. **As Bases Biológicas do Comportamento. Introdução à Neurociência.**

[s.l.: s.n.].

BRONSTEIN, P. M. On the predictability, sensitization, and habituation of aggression in male bettas (*Betta splendens*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 108, n. 1, p. 45–57, 1994.

BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned Fear as Revealed by Magnitude of Startle Response to an Auditory Stimulus. **Journal of Experimental Psychology**, v. 41, 1951.

BRUDZYNSKI, S. M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **Ilar J**, v. 50, n. 1, p. 43–50, 2009.

BTASZCZYK, J.; TAJCHERT, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 56, p. 919–925, 1996.

CALCAGNOLI, F. et al. Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. **Psychopharmacology**, v. 229, n. 4, p. 639–651, 2013.

CALCAGNOLI, F. et al. Acute and repeated intranasal oxytocin administration exerts anti-aggressive and pro-affiliative effects in male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 112–121, 2015.

CAMPOS, K. F. C. et al. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey-predator interaction test. **Behavioural Brain Research**, v. 240, n. 1, p. 160–170, 2013.

CANTERAS, N. S. et al. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 3, p. 297–305, 1997.

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 481–491,

2002.

CANTERAS, N. S.; MOTA-ORTIZ, S. R.; MOTTA, S. C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 321–327, 2012.

CANTERAS, N. S.; RIBEIRO-BARBOSA, É. R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 661–668, 2001.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 49–57, 2002.

CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.

CLEMENT, J. et al. Age-dependent changes of brain GABA levels, turnover rates and shock-induced aggressive behavior in inbred strains of mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 26, n. 1, p. 83–88, 1987.

DAVIS, M. Pharmacological and Anatomical Analysis of Fear Conditioning Using the Fear-Potentiated Startle Paradigm. v. 100, n. 6, p. 814–824, 1986.

DAVIS, M. et al. Fear-potentiated startle : a neural and pharmacological analysis. v. 58, p. 175–198, 1993.

DE ALMEIDA, R. M. M. et al. Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1–3, p. 51–64, 2005.

DE BOER, S. F. et al. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test

are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1125–1133, 1999.

DE BOER, S. F. et al. The neurobiology of offensive aggression: Revealing a modular view. **Physiology and Behavior**, v. 146, p. 111–127, 2015.

DIEDERICH, N. J. et al. Parkinson Disease With Old-Age Onset: A Comparative Study With Subjects With Middle-Age Onset. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 4, p. 529–533, abr. 2003.

EARLEY, C. J.; LEONARD, B. E. The effect of testosterone and cyproterone acetate on the concentration of γ -aminobutyric acid in brain areas of aggressive and non-aggressive mice.

Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 6, n. 4, p. 409–413, abr. 1977.

EVANS, C. S. Display vigour and subsequent fight performance in the siamese fighting fish, *betta splendens*. **Behavioural Processes**, v. 11, n. 2, p. 113–121, 1985.

FISCHER, J.; HAMMERSCHMIDT, K. Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders : insights. p. 17–27, 2011.

FISH, E. W. et al. 5-HT_{1B} receptor inhibition of alcohol-heightened aggression in mice: Comparison to drinking and running. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 1, p. 145–156, 2008.

FISH, E. W.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Escalated aggression as a reward: Corticosterone and GABA_A receptor positive modulators in mice. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 1, p. 116–127, 2005.

FITZGERALD, P. Long-acting antipsychotic medication , restraint and treatment in the management of acute psychosis. n. November 1998, 1999.

FRAGOSO, V. M. DA S. et al. Use of haloperidol and risperidone in highly aggressive Swiss

Webster mice by applying the model of spontaneous aggression (MSA). **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 110–118, 2016.

GAMMIE, S. C. et al. Neurotensin inversely modulates maternal aggression. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1215–1223, 2009.

GAMMIE, S. C.; LEE, G. GABAA receptor signaling in the lateral septum regulates maternal aggression in mice. v. 119, n. Pt 24, p. 5124–5136, 2010.

GINSBURG, B.; ALLEE, W. C. Some effects of conditioning on social dominance and subordination in inbred strain of mice. v. 15, n. 4, p. 485–506, 2016.

GIOVENARDI, M. et al. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology and Behavior**, v. 86, n. 1–2, p. 209–217, 2005.

GLAZER, W. M.; DICKSON, R. A. Clozapine Reduces Violence and Persistent Aggression in Schizophrenia. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, n. suppl 3, p. 8–14, fev. 1998.

GOTHELF, D.; APTER, A.; VAN PRAAG, H. M. Measurement of aggression in psychiatric patients. **Psychiatry Research**, v. 71, n. 2, p. 83–95, 1997.

GOUVEIA JR, A. O conceito de modelo e sua utilização nas ciências do comportamento : breves notas introdutórias . The concept of model and your utilization in the behavioral sciences : introductory short notes. **Revista Estudos de Psicologia**, p. 13–16, 1999.

GRAEFF, F. G. Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal Anxiety , panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 55 16, p. 3–6, 2007.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psychology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2010.

GRIMES, J. M.; RICCI, L. A.; JR, R. H. M. Glutamic acid decarboxylase (GAD 65)

immunoreactivity in brains of aggressive , adolescent anabolic steroid-treated hamsters. v. 44, p. 271–280, 2003.

GRIMSLEY, J. M. S. et al. Contextual Modulation of Vocal Behavior in Mouse : Newly Identified 12 kHz “ Mid-Frequency ” Vocalization Emitted during Restraint. v. 10, n. March, p. 1–14, 2016.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–658, 2012.

GUALTIERI, C. T.; SCHROEDER, S. R. Pharmacotherapy for self-injurious behavior: Preliminary tests of the D1 hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 14, n. Supplement 1, p. S81–S107, jan. 1990.

GUIMARÃES-COSTA, R. et al. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus . **Journal of Neuroscience Methods**, v. 165, n. 1, p. 25–37, 2007.

HESS, W. R.; BRUGGER, M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 1, p. 33–52, 1943.

HO, H. P. et al. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: An animal model of premenstrual irritability? **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 502–510, 2001.

HOLLY, E. N.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress : modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. p. 4469–4479, 2015.

KENNEDY, J. S. et al. A current review of olanzapine’s safety in the geriatric patient: from

pre-clinical pharmacology to clinical data. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, n. S1, p. S33–S61, dez. 2001.

KINCHESKI, G. C. et al. The Dorsolateral Periaqueductal Gray and Its Role in Mediating Fear Learning to Life Threatening Events. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

KLEINDORFER, S.; FESSL, B.; HOI, H. Avian nest defence behaviour: Assessment in relation to predator distance and type, and nest height. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 2, p. 307–313, 2005.

KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological Bulletin**, v. 128, n. 6, p. 961–977, nov. 2002.

KOCH, M. The Neurobiology of Startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 98, 1999.

KOFLER, M. et al. Influence of gender on auditory startle responses. v. 921, p. 206–210, 2001.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 22, p. 2007–2009, 2008.

KOOLHAAS, J. M. et al. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 77, p. e4367, 2013.

KOOLHAAS, J. M.; SCHUURMAN, T.; WIEPKEMA, P. R. The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. **Progress in Neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 247–268, 1980.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents : A review of behavior , neurobiology , and genetics. v. 30, p. 1045–1064, 2006.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.

Psychopharmacology, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.

LIU, G.-X. et al. Reduced Aggression in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1.

Journal of neuroscience research, v. 85, n. 11, p. 2352–2359, 2007.

LUISA, M.; CRAWLEY, J.; RICCERI, L. Neuroscience and Biobehavioral Reviews

Ultrasonic vocalizations : A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. v. 33, p. 508–515, 2009.

MAGGIO, J. C.; WHITNEY, G. Ultrasonic Vocalizing by Adult Female Mice (*Mus musculus*). v. 99, n. 4, p. 420–436, 1985.

MANDEL, P. et al. Inhibitory amino acids, aggressiveness, and convulsions. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 29, p. 1–9, 1981.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 192, n. 2, p. 185–190, 2008.

MATOS, R. J.; PEAKE, T. M.; MCGREGOR, P. K. Timing of presentation of an audience: Aggressive priming and audience effects in male displays of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behavioural Processes**, v. 63, n. 1, p. 53–61, 2003.

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. DE; GOUVEIA JR, A. Comportamento de peixes : Vantagens e utilidades nas neurociências. 2006.

MCDUGLE, C. J. et al. A Double-blind, Placebo-Controlled Study of Risperidone in Adults With Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 633–641, jul. 1998.

MCGINNIS, M. Y.; VAKULENKO, M. Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. v. 80, p. 81–88, 2003.

MCGREGOR, A.; HERBERT, J. Differential effects of excitotoxic basolateral and corticomedial lesions of the amygdala on the behavioural and endocrine responses to either sexual or aggression-promoting stimuli in the male rat. **Brain Research**, v. 574, n. 1–2, p. 9–20, 1992.

MCGREGOR, P. K.; PEAKE, T. M.; LAMPE, H. M. Fighting fish *Betta splendens* extract relative information from apparent interactions: what happens when what you see is not what you get. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1059–1065, 2001.

MICZEK, K. A. et al. Aggression , anxiety and vocalizations in animals : GABAA and 5-HT anxiolytics. p. 38–56, 1995.

MICZEK, K. A. et al. Aggressive behavioral phenotypes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 167–181, 2001.

MICZEK, K. A. et al. Social and neural determinants of aggressive behavior: Pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and g-aminobutyric acid systems. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 3–4, p. 434–458, 2002.

MICZEK, K. A.; DE BOER, S. F.; HALLER, J. Excessive aggression as model of violence: A critical evaluation of current preclinical methods. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 3, p. 445–458, 2013.

MICZEK, K. A.; O'DONNELL, J. M. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. **Psychopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 47–55, 1978.

MOLES, A. et al. Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice : A possible index of sociability ? v. 182, p. 223–230, 2007.

MOTTA, S. C. et al. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for

responding in subordinate conspecific intruders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4870–5, 2009.

MOTTA, S. C. et al. Ventral premammillary nucleus as a critical sensory relay to the maternal aggression network. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 35, p. 14438–43, 2013.

MOURA, L. M. et al. Morphine infusions into the rostralateral periaqueductal gray affect maternal behaviors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 899–905, 2010.

NARVAES, R.; DE ALMEIDA, R. M. M. Aggressive behavior and three neurotransmitters: Dopamine, GABA, and serotonin—a review of the last 10 years. **Psychology and Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 601–607, 2014.

NEHRENBURG, D. L. et al. An anxiety-like phenotype in mice selectively bred for aggression. v. 201, p. 179–191, 2009.

NIKULINA, É. M.; KAPRALOVA, N. S. Role of Dopamine Receptors in the Regulation of Aggression. v. 41, n. 4, p. 364–369, 1991.

NOBRE, M. J.; BRANDAO, M. L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 1, p. 45–52, jan. 2004.

NOBRE, M. J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M. L. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Hearing Research**, v. 184, n. 1–2, p. 82–90, 2003.

NUNES MAMEDE ROSA, M. L. et al. Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. **Neuropsychobiology**, v. 51, n. 4, p. 248–55, 2005.

NYBY, J. G. **Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology**. New York: CRC: Willott, J. F., 2001.

ODUM, E. P. **Fundamentals of Ecology**. Eugene P. Odum. Saunders, Philadelphia, 1953. **xii; 384 pp.** [s.l: s.n.]. v. 120

OLIVEIRA, R. F.; MCGREGOR, P. F.; LATRUFFE, C. Know thine enemy: ghting sh gather information from observing conspeci c interactions. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 265, n. March, p. 1045–1049, 1998.

OLIVIER, B.; MOS, J. I.; MICZEK, K. A. Ethopharmacological studies of anxiolytics and aggression. v. 1, p. 97–100, 1991.

OLIVIER, B.; YOUNG, L. J. Animal Models of Aggression. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**, v. 118, 2002.

PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: Influence of restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325–330, 2000.

PANKSEPP, J. B. et al. Affiliative Behavior , Ultrasonic Communication and Social Reward Are Influenced by Genetic Variation in Adolescent Mice. n. 4, 2007.

PARMIGIANI, S.; FRANCESCO FERRARI, P.; PALANZA, P. An evolutionary approach to behavioral pharmacology: Using drugs to understand proximate and ultimate mechanisms of different forms of aggression in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 143–153, 1998.

- PEAKE, T. M.; MATOS, R. J.; MCGREGOR, P. K. Effects of manipulated aggressive “interactions” on bystanding male fighting fish, *Betta splendens*. **Animal Behaviour**, v. 72, n. 5, p. 1013–1020, 2006.
- PELLOW, S. et al. Predators are attracted to the olfactory signals of prey. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 5, n. 3, p. 1–4, 1985.
- PLAPPERT, C. F.; PILZ, P. K. D.; SCHNITZLER, H. Acoustic Startle Response and Habituation in Freezing and Nonfreezing Rats. v. 107, n. 6, p. 981–987, 1993.
- POTEGAL, M. et al. GABA Binding in the Brains of Aggressive and Non-Aggressive Female Hamsters. v. 247, p. 315–324, 1982.
- RAMIREZ, J. M. Animal models in the research of human aggression. **Aggression and Violent Behavior**, v. 5, n. 3, p. 281–290, 2000.
- RICCI, L. A. et al. Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD 65) immunoreactivity in hamster brain : correlation with offensive aggression. v. 1035, p. 131–138, 2005.
- ROSELL, D. R.; SIEVER, L. J. The neurobiology of aggression and violence. **CNS Spectrums**, n. MAY 2015, p. 1–26, 2015.
- SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 180–186, 2015.
- SCATTONI, M. L. et al. Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T + tf / J Mouse Model of Autism. v. 3, n. 8, p. 48–52, 2008.
- SCHWARTZER, J. J.; RICCI, L. A.; JR, R. H. M. Interactions between the dopaminergic and

GABAergic neural systems in the lateral anterior hypothalamus of aggressive AAS-treated hamsters. v. 203, p. 15–22, 2009.

SIEGEL, A. et al. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. **Current neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 135–147, 2007.

SIMLER, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; MANDEL, P. gamma-Aminobutyric acid in brain areas of isolated aggressive or non-aggressive inbred strains of mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 16, n. 1, p. 57–61, jan. 1982.

SOARES, M. C. et al. Face your fears: Cleaning gobies inspect predators despite being stressed by them. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 3–8, 2012.

SOMA, K. K. Testosterone and Aggression: Berthold, Birds and Beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 99, n. January, p. e3, 2006.

SOREFF, S. M.; HOUGH, M. G. Aggression. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017.

STAPLES, L. G. et al. Rats discriminate individual cats by their odor: Possible involvement of the accessory olfactory system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1209–1217, 2008.

STORBECK, J.; CLORE, G. L. On the interdependence of cognition and emotion. **Cognition and Emotion**, v. 21, n. 6, p. 1212–1237, 1 set. 2007.

STORK, O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. v. 865, p. 45–58, 2000.

TAKAHASHI, L. K.; THOMAS, D. A.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)**, v. 97, n. 3, p.

207–212, set. 1983.

THOMAS, D. A.; TAKAHASHI, L. K.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)**, v. 97, n. 3, p. 201–206, set. 1983.

TWARDOWSCHY, A. et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae). **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, p. 1149–59, 2013.

URIBE-MARIÑO, A. et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412–21, 2012.

VAN KAMPEN, H. S. Violated expectancies: Cause and function of exploration, fear, and aggression. **Behavioural Processes**, v. 117, p. 12–28, 2015.

WAAL, F. B. M. DE. What is an animal emotion ? v. 1224, p. 191–206, 2011.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic Effects of High Illumination Levels Assessed with the Acoustic Startle Response in Rats. v. 3223, n. 96, 1997.

WALLACE, B. Ritualistic Combat and Allometry. v. 36, n. 3, p. 627–652, 2014.

WESSON, D. W. Sniffing behavior communicates social hierarchy. **Current Biology**, v. 23, n. 7, p. 575–580, 2013.

WILLEY, A. R.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Social interactions and 50 kHz

ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. v. 202, p. 122–129, 2009.

WILLIAMS, W. O.; RISKIN, D. K.; MOTT, K. M. Ultrasonic Sound as an Indicator of Acute Pain in Laboratory Mice. v. 47, n. 1, p. 8–10, 2008.

YANG, M. et al. The rat exposure test: A model of mouse defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 465–473, 2004.

Anexo

A behavioral and pharmacological evaluation of aggressive behavior in mice
previously exposed to fear or anxiety-like stimuli

Neto JSC, ^a and Nobre MJ ^{a,b}

^a Departamento de Psicologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo (USP), 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

^b Departamento de Psicologia, Uni-FACEF, 14401-135, Franca, SP, Brasil.

Corresponding author: M.J. Nobre

Laboratório de Psicobiologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14090-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Phone: 551636023788

Fax: 551636024830

E-mail: mjnes@usp.br

ABSTRACT

Aggression is defined as a set of behaviors, mainly directed to a conspecific, for protection and/or acquisition of resources. Thus, anxiety and fear-like behaviors may be triggered on these survivors' situations. Since aggression and fear are highly correlated, in the present study, we further investigated whether previously exposure to threat environments or conditions (*open field and elevated plus-maze test, predator (rat) and foot-shocks*) that triggers anxiety/fear can modulate or change future aggressive behavior in mice. For this, we used the well-known resident-intruder test. To achieve this goal, the animals were previously exposed to different situations able to elicit a state of anxiety and/or fear and later submitted to the agonistic encounter. Changes on the emotional reactivity induced by the independent variables used were measured using the ultrasonic vocalizations analysis. In order to verify the influence of GABA and dopamine systems on the modulation of aggression pharmacological manipulations were conducted with the systemic administration of the benzodiazepine diazepam and the dopamine D2 agonist apomorphine previously to the resident-intruder test.

Keywords: aggressive behavior, stress, fear, anxiety, resident-intruder paradigm

1. INTRODUCTION

In general, the term aggression, or aggressive behavior, has long been used as related to violence or meaning something linked to ferocity or brutality (SOREFF; HOUGH, 2017). However, this is not true at all. Despite aggressive behavior have not been classified as a mental disorder it has been largely associate with certain psychopathologies including adult and children physical violence and abuse, mood disorder and intermittent explosive disorder (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Notwithstanding, fewer studies have been addressed to understand the nature and causes of aggression.

Intraspecific competition (conspecific interaction) by resources is a disharmonious ecological relation which creates a winner and a loser (ODUM, 1954). This duality is the basis of the resident-intruder paradigm (KOOLHAAS et al., 2013; KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980; MICZEK et al., 2001; OLIVIER; YOUNG, 2002) Therefore, it is supposed that winning of an aggressive encounter increases the probability that an individual will behave aggressively in the future (GINSBURG; ALLEE, 2016; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; MCGREGOR; PEAKE; LAMPE, 2001; MICZEK et al., 2001). This assumption is supported by studies on the aggressive behavior in fish (OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998) and rodents (ARCHER, 2009). In fact, it was showed that aggression can be positively reinforced (BANNAI et al., 2007; FISH et al., 2008; FISH; DEBOLD; MICZEK, 2005).

There seems to be a correlation between anger and aggression in humans (ARCHER, 2009) and aggressive behavior triggered by particular situations/stimuli in non-human mammals (ALCOOK, 2013). Many studies have used animal models to assess the modulation of aggressive behavior to understand aggression in humans (BLANCHARD; BLANCHARD,

2003). When the animal faces certain situations, for example, the invasion of the territory by a co-specific, the behavioral response exhibited by the animal is divided into two linear appetitive and consummatory components. The first is linked to a set of responses that increase the probability of succeeding the animal (for example, the aggressive display). The former is related to a response that shuts up a chain of events (attack/bite) (MCGREGOR; HERBERT, 1992; MOURA et al., 2010). The act of biting a co-specific is a behavior classified as consummatory (MICZEK et al., 2001). When disproportionally, this response cannot be understood as functional (aggressive behavior), but by a dysfunctional violent response (KOOLHAAS et al., 2013; MICZEK; DE BOER; HALLER, 2013). This same interpretation of dysfunctionality given to the violent behavior of animals is applied to humans in the diagnostic criteria and differential diagnoses of psychiatric disorders in DSM-V. Therefore we can consider aggression, as an evolutionarily selected functional behavior. Otherwise, violence, or excessive aggression is clearly pathological and dysfunctional (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; OLIVIER; YOUNG, 2002). At this point, the question that rises is whether previous exposure to acute episodes of fear will intensify aggression during future agonistic encounters.

The perception of the environment is the first step to assess situations that may or may not threaten survival (risk assessment). Any other animal that can interact in a non-threatening way (puppies and females) or threatening (co-specific competitors and predators) will produce visual, auditory or olfactory stimuli. In the case of small rodents (PELLOW et al., 1985; STAPLES et al., 2008), olfactory cues, for example, are used to identify co-specific and distinguish odors from predators; a very useful ability in situations involving the "hunter-prey" confrontation. However, vocalization (GRIMSLEY et al., 2016; MICZEK et al., 1995;

WILLIAMS; RISKIN; MOTT, 2008) is also used, but to exchange information between co-specifics (puppies and females normally). Vocalization is a behavioral response emitted by the animal defined by the sound emitted by a stimulus. Sound can be conceptualized with something that can be heard, however, rodents have an ultrasonic vocalization ($> 20\text{kHz}$) that humans (among other animals) cannot hear (FISCHER; HAMMERSCHMIDT, 2011; MAGGIO; WHITNEY, 1985; PANKSEPP et al., 2007; WILLIAMS; RISKIN; MOTT, 2008).

All these descriptions are made of individuals interacting with co-specific or co-specific threats. The Resident – Intruder paradigm (RI test) is one of the different approaches carried out in the laboratory to study aggressive behavior in rodents (RAMIREZ, 2000), the most common protocol being isolation-induced aggression where animals are placed in isolation, and then an intruder previously housed in a group is introduced into the cage/box of the resident (MICZEK et al., 2001). Another strategy to increase the territoriality of the resident animal is to keep the male with a female, and then separate them to confront an intruder previously housed in a group (KOOLHAAS et al., 2013). In addition, there are different strain created with slightly different aggressive behavior scores, for example, the wild rat is more aggressive than the strain produced in/to the laboratory (KOOLHAAS et al., 2013; MICZEK et al., 2001; MICZEK; DE BOER; HALLER, 2013). difference was taken into account when it was transposed to mice in the choice of experimental animal to be the resident and to be the intruder.

The neuropharmacological basis of defensive responses are well defined. However, regarding the biological and pharmacological basis of aggression little is known, to date. Studies aimed to assess the neuropharmacology of aggression using a co-specific intruder as a stressor showed that the systemic treatment with 5-hydroxytryptamine in the resident animal

promotes anti-aggressive effects, decreasing the attack behavior (and offensive score) during the test resident-intruder in rats (DE BOER et al., 1999; KOOLHAAS et al., 2013; KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980). A similar reduction in aggression was observed after the administration of 5-HT agonists in the dorsal raphe nucleus (BANNAI et al., 2007). However, using a different protocol Fragoso et al. (2016) identified a reduction in the number of attacks following systemic administration of risperidone, an antipsychotic that blocks D2 receptors that may act as a 5-HT agonist (1A / 2A). In addition, an intra-periaqueductal gray injection of morphine decreases the emission of maternal protective behavior in rats (MOURA et al., 2010) that has been related to aggressive behavior (RAMIREZ, 2000). Therefore, among all neurotransmitters able to changes aggression in both animals and man, 5-HT has been reputed; despite other studies have pointed out the influence of GABAergic neurotransmission on aggression (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; HO et al., 2001; SIEGEL et al., 2007; SOARES et al., 2012). Despite this, there are few studies that address how stress triggered by situations that provoke fear and anxiety can modify aggressive behavior.

Rationale

Although the study of the pharmacological and neural substrates involved in the modulation of the behavioral responses of defensive behavior have advanced in the last decades (AGUIAR et al., 2005; CANTERAS; MOTA-ORTIZ; MOTTA, 2012; GINSBURG; ALLEE, 2016; GIOVENARDI et al., 2005; GRAEFF, 2007; GROSS; CANTERAS, 2012; KLEINDORFER; FESSL; HOI, 2005; PEAKE; MATOS; MCGREGOR, 2006; SAITO; BRANDÃO, 2015; SOMA, 2006), the study of the correlation between stress (fear and anxiety) and aggressiveness is lacking. Thus, the present study was aimed to investigate

whether mice previously exposed to stressful situations will increase aggressiveness against non-resident male mice, as revealed by the resident-intruder test. In addition, we further examine the changes on emotionality induced by independent variables and the influence of systemic modulation of GABA and dopamine neurotransmission on these responses.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

Adult male mice BALB/c (*Mus musculus albinus*, 20-30 g (6/9 weeks) from the University of São Paulo, *Campus* of Ribeirão Preto, Brazil.) were housed as “resident” in individual boxes (540 cm²). As “intruders”, C57BL/6 mice (*Mus musculus albinus*, 20-30 g, from the University of São Paulo, *Campus* of Ribeirão Preto, Brazil) were maintained grouped in plastic boxes (1354 cm², 12 mice per cage). All mice were at 24 ± 1 °C, on a 12 h light cycle, with free access to water and food throughout the experimental period, except during the brief test periods. The experiments were carried out in compliance with the recommendations of SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) and with the approval of the Animal Care and Use Committee of the University of São Paulo-Brazil, Campus of Ribeirão Preto (Protocol number 2014.1.383.58.4). As requested, all efforts were made to minimize animal suffering.

2.2. Experimental situation

Over all, in this study, behavioral evaluation was conducted with the use of several different stressful stimuli, and divided in two parts, as follows: (1) open field, elevated plus maze, mouse odor, exposure to mouse. (2) foot-shocks. Regarding the former, ultrasonic

vocalizations were recorded in order to analyze the changes induced on emotionality along treatment, as described elsewhere.

2.3. Experimental protocol

2.3.1. Part 1 (ethological study): (1~10th day) Exposure to the experimental Cage, (11th day) Open Field/Mouse Exposure/Elevated Plus Maze, (12th day) Resident Test – Intruder test, (13th day) Open field (Arena).

Experimental apparatus and procedures

Resident–Intruder paradigm

This paradigm aims to establish hierarchy in a dominant and submissive relationship through confrontation, where normally the intruder presents behavior of submission to the resident. The use of a non-aggressive as well as resident animal aims at the possibility of variation as aggressiveness (for more or less). In turn, if using a more aggressive animal as an intruder, we can visualize the level of aggressiveness of the resident. Choosing to keep the intruder in social life means that he does not see the resident as an intruder but rather as another individual in the colony and uses time to explore the new environment. Intruder animals (C57 - which is more aggressive (KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980; NIKULINA; KAPRALOVA, 1991)) will be introduced into the resident's box (BALB/c) for a period of 300 seconds where the following parameters will be observed (KOOLHAAS et al., 2013): attack latency, offensive score, rearing, social exploitation score and inactivity. In addition, the behaviors: Lateral Threat, upright posture, clinch attack, keep down and chase were grouped into a category called "offensive score". The behaviors social exploration, ano-genital sniffing and social grooming grouped into "social exploitation score".

The attack latency was quantified from the record of the first attack (grab / roll) emitted by the resident, as an index of aggression.

Ethological description of the behaviors was interpreted based on studies using the same parameters (KOOLHAAS et al., 2013; KOOLHAAS; SCHUURMAN; WIEPKEMA, 1980): Attack Latency: Time the animal takes to start the attack on the co-specific. Start counting the time when the animals are in the same box. If the attack does not occur the latency time is total (300 seconds); Move towards: Reduction of the distance between the individual and the co-specific followed by contact (item 6, 9 or 10), different from item 13, where the exploration of the environment can cause the animals to get close; Rearing: The animal is positioned on the hind legs (item 5) but without "disharmonic" interaction with the co-specific and with the front legs normally facing downwards or supported on the wall of the box; Lateral threat: Slow or instantaneous exposing the side of the body when feeling threatened or after the emission of item 6, body close to the ground, being able to move away the co-specific with a paw (front or back); Upright posture: The same behavior emitted in item 3 only that emitted when it feels threatened or after the emission of item 6, with the pairs of diatoms pointed towards the co-specific; Clinch attack: Very fast movement where the animals roll in the box, (which may or may not contain "bites", but because of the speed that happens in mice, this item is not counted), which is interrupted when an individual emits the behavior described in item 6 or an individual (or both) issues the behavior described in item 5; Keep down: Action of positioning on top of the co-specific keeping one or both of the front legs in contact. Behavior presented after item 6 (or after item 5 when the co-specific issues item 4); Chase: Follow the co-specific individual after item 5 ~ 7 followed by one or more of the same items as above; Social exploitation: Action of sniffing the body of the co-specific individual

except in the ano-genital region; Ano-genital sniffing: Action of sniffing the ano-genital region of the co-specific individual; Social Grooming: Emission of grooming behavior in the co-specific individual; Inactivity: Do not move, independent of the proximity of the co-specific or previous attack.

Open Field

The open field test was performed in a polyethylene cylinder of 300 mm diameter with the base divided into twelve quadrants. The test is conducted at room temperature (24 ± 1 °C) with artificial light conditions similar to use in maintenance vivarium, with a duration of 5 min. The resident mice are placed in the center of the open field apparatus and activity was evaluated by direct observation of the total number of squares entered (TSE), latency of movement (LM), time spent in the central arena (TC), time spent in the periphery arena (TP), number of defecations (D) and number of micturition (M). The open field test was used to elicit fear or anxiety, as well as, elevated plus maze apparatus and direct exposure to the predator, rat, 24 h before the resident-intruder test. And 24 h after the Resident–Intruder test, to all resident mice to assess whether there is change in behavior due to confrontational situations that promote fear and/or anxiety (PADOVAN; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000).

Elevated plus-maze

This apparatus consisting of two open arms (15 cm x 66 cm) crossed at right angles with two closed arms of the same size. The two closed arms were enclosed with by walls 50 cm high, with the exception of the central part of the maze (10 cm x 10 cm) where the open and closed arms crossed. The entire apparatus was elevated 40 cm above the floor and it was placed in a room with minimal visual cues visible to the mouse. To prevent the rats from falling, a rim of Plexiglas (0.5 cm high) surrounded the perimeter of the open arms. The mice

were gently placed in the central area of the EPM with its nose facing one of the closed arms and was allowed to freely explore the maze for 5 min. Conventional EPM measures (i.e. number of entries and time spent in each arm) were recorded (Lister, 1987). In addition to these data, it was also quantified: Head dipping (HD) and risk assessment behavior (RA).

Rat exposure

The apparatus used for the Rat Exposure Test (RET) (CAMPOS et al., 2013; YANG et al., 2004) was adapted in this study. The RET used consisted of a transparent rectangular arena divided into a predator environment (30 x 30 x 30 cm) and a risk area for the prey (30 x 30 x 30). This apparatus provides a home chamber (7 cm x 7 cm x 12 cm) connected via a cylindrical tunnel (4.4 cm x 13 cm) to hazardous area safe area lined with wood shavings (Figure 1). The rat (*Rattus norvegicus*) was placed in the predator area and the mouse (experimental resident) was placed in the safe area (home chamber). The test was performed during 10 min, with 5 min to habituation and 5 min to direct exposure to predator. Outcome measures evaluated were: risk assessment/Stretched-attend postures (SAP), time spent in the home chamber (H), time spent on the surface (S) stretch approach (SA), freezing (F, in seconds) e defensive burying (DB).

The apparatus used for exposure to odors and predators consists of a transparent rectangular arena, due in a predatory environment (30 x 30 x 30 cm) and a prey environment (30 x 30 x 30 cm). Attached to the prey area there is a cylindrical tunnel (4.4 x 13 cm) that connects the risk area to the secure area (7 x 7 x 12 cm) lined with shavings.

Rat odor exposure

Exposure to predator odor (mouse) will be performed in a manner similar to that described by Staples (2008). This model of exposure consists of exposure of the mouse to the

odor of rats (*Rattus norvegicus*-Wistar line). This test will consist of an experiment where the mouse will be exposed to a piece of synthetic fabric that has been kept in contact with the animal for a period of 15 days. This fabric will be cut beforehand in several pieces and arranged in the environment of accommodation of the animal, to come in contact with urine, feces and other peculiar odors of the animal. Twelve (12) symmetrical pieces (size, length and thickness) to avoid measurable differences by the experimental animals will be separated from those obtained and will be used in the experiments. The mice will be introduced into the experimental odor exposure apparatus in an area separated by an opaque barrier of the same material from the apparatus that will be removed after the period of habituation of the animal. The test will have 10 m in total, 5 m of habituation and 5 min of experimentation. It will be observed for analysis: latency to initiate the risk assessment behavior (TLAR), latency to enter the risk area (TL), time spent in the safe area (SAD), time in the area of risk (TAR).

2.3.2. Part 2 (foot-shocks, USV recording and pharmacological analysis): (1st day) Shock conditioning and Resident-Intruder Test (RI Baseline), (2nd day) shock conditioning + saline + resident – intruder test (RI), (3rd day) Shock conditioning + apomorphine + RI, (4th day) Shock conditioning + diazepam + RI.

Footshocks

Foot-shocks (0.4 mA, 1 s) were produced by a shock generator (Insight, Sao Paulo, Brazil). One aversive session was performed, with 30 trials being used. Interstimulus interval (ISI) was maintained in 30 seconds with a variance of 50% to avoid the animals to learn about the experimental schedule used. Therefore, in our study we used an experimental protocol that avoid induction of learned helplessness, and the establishment of learned fear as well. The foot-shocks protocol used here was that commonly used in other studies to induce a state of

aversion but not intense fear (Davis et al. 1993; Plappert, Pilz, and Schnitzler 1993; Walker and Davis 1997).

Ultrasonic Vocalization record (USV)

The apparatus used for recording and analysing the USV has been described in detail in previous reports (BASSI et al., 2007; NOBRE; BRANDAO, 2004; NUNES MAMEDE ROSA et al., 2005). Briefly, it consisted of a testing box ($25 \times 15 \times 12$ cm) made of steel bars spaced approximately 12 mm apart. This experimental chamber was situated inside a larger, padded, echo-free (sound-attenuated) and ventilated chest ($60 \times 40 \times 45$ cm) with a 28 W red light bulb located at the top of the chamber. RI test was performed in this chamber. For recording and analysis of USV, four ultrasound bat detectors (Ultra Sound Advice, London, UK) were mounted in the lateral and rear walls of the chamber and linked to a multichannel audio apparatus with 20-KHz low band pass (cut-off) filter (Noldus Instruments, Amsterdam, The Netherlands) and then fed into a computer. During each testing session, each bat detector was tuned to a different frequency 20-, 22-, 24- or 26-KHz to record the USV. Frequencies and duration were grouped and presented in scores. The choice of the frequencies above was based on previous studies which showed that rodents exposed to dangerous situations display an enhancement of the emissions of 22- and 24-KHz USV that do not differentiate from each other (NOBRE; SANDNER; BRANDÃO, 2003; NUNES MAMEDE ROSA et al., 2005). The same studies showed that the 20- and 26-KHz frequencies are emitted less. USV were recorded immediately after the agonistic encounter, being recorded for 5 minutes. The number of calls and duration of USV emission in seconds were analyzed by a sonograph (Ultravox signal analysis work station, Noldus Instruments, Amsterdam, The Netherlands), stored on a hard disc and subsequently transferred to tables in a spreadsheet programme (Excel; Microsoft

Corp., Mountain View, CA, USA) for off-line analysis. Each frequency input in each of the four microphones used was calibrated before the session began with the use of an audio generator (GW, 1 MHz, NJ, USA).

Drugs

Drugs used were the benzodiazepine diazepam (0,5 mg/kg/ml, s.c., Sigma-Aldrich – USA) and the dopamine D2 agonist apomorphine (2.5 mg/kg/ml, s.c. Sigma-Aldrich – USA). Pharmacological treatments were performed to evaluate their actions on the modulation of fear/anxiety associated with aggression. The doses used were based on previous studies (NIKULINA; KAPRALOVA, 1991; OLIVIER; MOS; MICZEK, 1991). All drugs will be diluted in sterile saline (0.9%). Acute administration was performed 15 minutes before exposure to intruder resident tests.

2.4. Euthanasia

After the ending of the experiments the animals were sedated by an overdose of diazepam (20 mg/kg) and 15minutes later exposed to subsequently Carbon Dioxide (CO², 85%) for additional 15 minutes. The interruption of vital functions of the animal was evidenced by the absence of respiration, heart beat and muscle reflex.

2.5. Statistical analysis

Part 1: Data are reported as the means $\pm$ standard error of the means (SEM). Data from open field test were analyzed by the Mann-Whitney U test. Remaining data were analyzed by a Kruskal–Wallis non-parametric ANOVA. Main differences among groups were determined by *post hoc* test X², with the level of significance set at $P < 0.05$.

Part 2: Due to the nature of the experimental design

n (subject as its own control), a Repeated Measures ANOVA (One-Way) analysis was used. Post hoc Newman-Keuls Multiple Comparison Test determined the difference between the groups, with the level of significance set at $P < 0.05$.

3. RESULTS

Part 1: The results obtained in the present study show that the pre-exposure to aversive situations that trigger fear and/or anxiety (OF, EPM, Rat or Odor) changes mice behavior on the resident-intruder paradigm, despite attack latency did not change between groups (**Table 1, Fig. 1**). Moreover, the direct exposure to a predator (rat) modifies the number of crossing in the open field test, independently of the RI paradigm (**Fig. 2**). The one-way ANOVA applied on the results of the RI paradigm revealed significant difference in the move toward ($F_{4,32} = 10.30$; $p < 0.0001$), social exploration score ($F_{4,32} = 217.4$; $p < 0.0001$), non-social exploration score ($F_{4,32} = 178.0$; $p < 0.0001$). The post hoc test Newman-Keuls indicated that Rat exposure reduced the frequency of the variables move towards behavior and social exploration when compared to the other groups ($p < 0.05$, **Fig. 1**). In contrast, in the group submitted previously to OF the social was observed an increase in the social exploration behavior compared to the other groups ($p < 0.0001$, Newman-Keuls, **Fig. 1**). Regarding the non-social exploration score, the groups exposed to OF, EPM, Rat or Odor reduced the duration of the non-social exploration time (**Fig. 1**) when compared to control group ($p < 0.0001$, Newman-Keuls). Again, the non-social exploration in the OF group was different compared to EPM. RAT and ODOR groups ($p < 0.0001$, Newman-Keuls, **Fig. 1**). Finally, the one-way ANOVA applied on the offense score parameter showed no difference among all

groups (**Fig. 1**). To examine whether the exposure to an intruder conspecific would alter the natural exploratory behavior or locomotor, independent groups were submitted only to aversive stimuli without performing RI paradigm. The two-way ANOVA applied in the number of crossing revealed a difference considering the factor aversive stimuli ($F_{4,47} = 3.904$; $p = 0.008$). The Newman-Keuls post hoc test showed that the number of crossing in the groups previously submitted to direct exposition to a predator (Rat) increased when compared to Control and Odor groups (**Fig. 2A**). However, Control, OF, EPM and Odor groups did not differ among them (**Fig. 2A**). Moreover, the time spent in the central area and peripheral area during the OF test performing 24h after the RI paradigm did not differ in all groups (**Fig. 2B**). Regarding the defensive behavior of the intruder, the present results showed did not alteration defense, clinch, social exploration and non-social exploration (**Table 1**).

Part 2: Shock conditioning

For these experiments, the data obtained of RI after exposure to shock in the paw a Repeated Measures ANOVA show significant difference in: Attack Latency ($F_{3,27} = 18,12$; $p < 0,0001$), Rearing ($F_{3,27} = 3,966$; $p = 0,0248$), Offensive Score ($F_{3,27} = 32,11$; $p < 0,0001$), Social Exploration Score ($F_{3,27} = 16,40$; $p < 0.0001$) and Inactivity ($F_{3,27} = 183,2$; $p < 0.0001$). The *post hoc* Newman-Keuls test indicated the effect of Diazepam on the reduction of the Attack Latency ($p < 0.0001$) (**Fig 4A**) and Inactivity ($p < 0.0001$) (**Fig. 5A**), while in the Offensive Score parameter ($p < 0.0001$) there was an increase (**Fig. 3**). In relation to the Apomorphine effect, the only component that increased was Inactivity ($p < 0.0001$) (**Fig. 5A**), while in the components Rearing ($p = 0.0248$) (**Fig. 4B**) and social exploration ($p < 0.0001$) (**Fig. 5B**) presents a reduction.

Shock conditioning + Ultrasonic vocalization recording

Using the same protocol, however, to later quantify the vocalization of the animals, the following parameters were also statistically different: Attack Latency ($F_{3,31} = 21,91$; $p < 0.0001$), Rearing ($F_{3,31} = 7,687$; $p = 0,0012$), Offensive Score ($F_{3,31} = 48,88$; $p < 0.0001$), Social Exploitation Score ($F_{3,31} = 16,40$; $p < 0.0001$) and Inactivity ($F_{3,31} = 153,3$; $p < 0.0001$). The Newman-Keuls test post showed that on the apomorphine effect, there was a reduction in the parameters: Rearing ($p = 0,0012$) (**Fig. 7B**) and Score of social exploration ($p < 0.0001$) (**Fig. 8B**). And with regard to the item Inactivity ($p < 0.0001$) (**Fig. 8A**), as in the previous experiment, there was a significant increase. Regarding the effects of diazepam, there was a reduction only in the Attack Latency ($p < 0.0001$) (**Fig. 7A**), whereas in the items: Offensive Score ($p < 0.0001$) (**Fig. 6**) and Social Exploitation Score ($p < 0.0001$) there was an increase (**Fig. 8B**). Regarding USV, Repeated Measures ANOVA presents difference in Number of events ($F_{4,39} = 14,61$; $P < 0.0001$) (**Fig. 9A**) and Total Duration ($F_{4,39} = 8,569$; $P < 0.0001$) (**Fig. 9B**). The post hoc Newman-Keuls test indicated an increase on the number of vocalization events and the total duration of vocalization under the influence of Diazepam ($p < 0,0001$).

4. DISCUSSION

Within the subphylum of vertebrates, we can see the most diverse forms of emission of aggressive behaviors. As an example, in fish, the aggressive behavior of the *Betta splendens* (Siamese fighting fish) is quite stereotyped and well visually recognized. That is the reason why it is so much used in aggression studies (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; EVANS, 1985; MATOS; PEAKE; MCGREGOR, 2003; OLIVEIRA; MCGREGOR; LATRUFFE, 1998). For snakes, the variety of aggressive responses involves postures with intertwined

bodies, head slightly suspended from ground level, and positioning face to face with a third of the body lifted horizontally (less than 90°) (BOGERT; ROTH, 1956). Regarding mammals, the defensive attack has been described in cats as a set of behaviors involving arching back of the spine, retraction of the ears, piloerection, pupil dilation, impulsivity, audible or ultrasonic vocalization, pointing the anterior paw toward the threatening stimulus, and the performance of frontolateral attack movements (SIEGEL et al., 2007). All these defensive behavioral repertoires can be divided into two large groups: innate or unconditioned responses and conditioned or learned. Innate defensive behaviors are responses to potential threats that do not require any prior learning, such as confrontation between prey and predator. On the other hand, learned or conditioned responses are related to behaviors triggered by threatening stimuli that have previously elicited defensive responses or activated the brain's defense circuits. In both cases, the animals react to fear-eliciting situations (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GROSS; CANTERAS, 2012; GUIMARÃES-COSTA et al., 2007). In our study, we were interested in understanding whether previous experience with several different stressful stimuli could alter the aggressive behavior of mice against a male intruder using the RI paradigm. Additionally, we further investigated the effects of systemic modulation of GABA and dopamine neurotransmission on this response and also the effects of stress and drugs treatments on mice emotionality.

Previous reports have suggested that the daily stress experiences can promote an upregulation of aggressive behavior in humans (GOTHELF; APTER; VAN PRAAG, 1997; ROSELL; SIEVER, 2015). In our study, the present results showed that distinct aversive situations can produce different effects in the aggressive behavior evaluated in the resident-intruder paradigm. Particularly, pre-exposure to a natural predator largely reduces the

movement towards social and non-social exploration. Furthermore, other aversive situations which are commonly known to trigger anxiety-like behavior, such as open field test, elevated plus maze test and predator odor exposition also decreased non-social exploration behavior. It is important to note that direct exposure to a predator promoted an increase in the number of crossing in the open field test which can indicate a modification in the locomotion. The time spent in the central and peripheral sectors of the open field test performed after RI paradigm did not differ in all experimental groups pre-exposed to distinct aversive situations.

The results obtained in the present study corroborate previous findings that have suggested that aversive situation can modify behavioral parameters associated to fear and anxiety in a different manner (BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003; KOOLHAAS et al., 2013; MICZEK; O'DONNELL, 1978; ROSELL; SIEVER, 2015; WESSON, 2013). In particular, it is possible to hypothesize that the fear and/or anxiety produced by exposed to open spaces (i.e. open field test) resulted in move towards social exploration behavior, and on the parameters when related to the offence score (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003; CALCAGNOLI et al., 2015). In contrast, our results showed also that the exposure to a predator (rat exposure) decreased the same behaviors parameters (MT and SE), which may suggest that the presence of a predator interacts with conspecific characteristics in background (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 2003; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003). On the other hand, the exposure to a predator promoted an increase in the number of crossing in the open field test, independently of the performing RI paradigm, which can suggest an increased in the locomotion activity when the threat (the predator) has not been identified yet.

As further evidence of modulation of the aggressive behavior, stressfully situations such as, open spaces (open field test) (CHOLERIS, 2001), height (elevated plus-maze test) (KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008) and predator risk (predator exposure / predator odor exposure) (CANTERAS et al., 1997) produce a reduction in the no-social exploration parameter evaluated in the RI paradigm. This effect can be related to an increase in risk assessment behaviors and territorial protection looking for potential threats. The exploration of the environment is a natural behavior emitted by rodents, which was associated with a positive motivational reinforcing effects and when this behavior is compromised this suggest a modulatory effect on the emotional or motivational domains (LEUSSIS; BOLIVAR, 2006; VAN KAMPEN, 2015).

The negative modulation in the aggressive parameters, like Offence Score (DE BOER et al., 1999; KOOLHAAS et al., 2013) or the positive modulation in the number of attacks (bites) (FISH et al., 2008; FRAGOSO et al., 2016) during RI paradigm, can be regarded examples of modulations that affects, specifically, the aggressive parameters. However, the RI paradigm comprises other outcomes measures that include social and non-social exploration; which are related to inspecting the opponent and the elements of ambulation and rearing, respectively (DE BOER et al., 1999). In this way, the present results showed that pre-exposure to aversive situations reduced social and non-social exploration, which can suggest that previous fear or anxiety experiences are able to modulates risk assessment behavior. As we have no direct reduction in aggressiveness, but a change in others behavioral parameters we can infer that exposure to situations that cause fear or anxiety have an indirect effect on the modulation of the aggressive behavior, making the animal spend more time and effort to evaluated the environment and the conspecific than actually attack the intruder.

Regarding the neural substrate responsible for emotional behavior, the stressful and threatening situations promote an activation in several areas of the brain, among them, the dorsal area of the mammillary nucleus (MARTINEZ et al., 2008), medial hypothalamus (CANTERAS, 2002), anterior hypothalamic nucleus (CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001), dorsomedial part of the ventromedial nucleus (MOTTA et al., 2013). These structures along with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis are closely related and connected through the lateral septum (GAMMIE et al., 2009) with amygdala (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988) and hippocampus (DE BOER et al., 2015), areas that are directly related to aggressive behavior modulation. Moreover, in a situation the nature when the animal had to fight to defend/for resources (competition), corticosterone released by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis promoted a inhibition on the serotonin mechanisms and an increase in the GABA neurotransmission potentiating the aggressive behavior (FISH; DEBOLD; MICZEK, 2005; PARMIGIANI; FRANCESCO FERRARI; PALANZA, 1998; ROSELL; SIEVER, 2015). In fact, the activation of neural circuitry related to fear and anxiety can be modulating areas such as, amygdala and lateral septum, potentiating the predator- or environment-induced stress (open field and elevated plus-maze), resulting in an decrease in the intensity of overall animals defense (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 2003; BLANCHARD; WALL; BLANCHARD, 2003; CANTERAS; RIBEIRO-BARBOSA; COMOLI, 2001). Taken together, these findings can give support to the present results where were a reduction on move toward behavior, social and non-social exploration in the RI paradigm after the resident mice were submitted to test that triggers fear or anxiety were observed (open field, elevated plus-maze, predator and odor predator exposition).

Contrary to our findings, the study of Nikulina and Kapralova (1991) showed that the acute administration of apomorphine increases the aggressiveness of BALB/c mice exposed to stressful situations (footshocks). However, just as they identified different strains presenting different responses to the same drug/dose, perhaps age is also an item to be analyzed. The reduction in attack latency and downtime as well as the increase in the offensive score are data showing the positive modulatory effect of diazepam on the aggressiveness of the animals, data that corroborate the findings of several researchers (MICZEK et al., 2002; OLIVIER; MOS; MICZEK, 1991). Stressful situations have the ability to modulate animal behavior, and when evaluated in the ultrasonic vocalization these situations increase drastically the number of emissions and the total time of emission emitted by the animal. Apomorphine successfully blocked the influence of foot shocks on the ultrasonic vocalization, reducing the rate to basal levels whereas the acute administration of diazepam did not have an effect, remaining similar to saline administration.

In conclusion, the present data can indicate that previous situations that trigger fear or anxiety can modulate the outcome measures evaluated in the RI paradigm in a different manner. So, exposure to open spaces (open field test), that can be related to risk assessment behavior, increased move towards behavior and social exploration, and reduces non-social exploration, which can suggest an increase in the environmental analyses (related to an increase in conspecific interaction). On the other hand, previous fear experience, such as predator and odor predator exposition, promoted a reduction in conspecific interaction, that were indicated to a decrease in the social (only rat exposition) and non-social exploration, and in the move toward behavior, particularly after the presence of a predator. Moreover, the direct

exposure to a predator improved the locomotion behavior evidenced by the increase in the number of crossing in the OF test, independently of confront with an intruder.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP (Proc. no. 2014/23690-5). M.J. Nobre is recipient of a Productivity Research Grant from CNPq (303144/2015-7). Neto JSC holds a master scholarship from CAPES.

Tables and Figures

Group	n	ATL	Defense	Clinch	Social Exploration	Non-social Exploration
Control	4	300.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	80.1 ± 2.2	190.9 ± 5.8
OF	8	300.0 ± 0.0	2.1 ± 1.1	4.0 ± 2.1	98.0 ± 18.1	195.7 ± 18.8
EPM	7	266.4 ± 15.8	4.5 ± 1.2	4.1 ± 1.4	99.7 ± 14.5	191.5 ± 13.9
Rat	8	300.0 ± 0.0	1.2 ± 0.6	1.6 ± 1.4	80.5 ± 4.9	216.5 ± 3.9
Odor	6	260.0 ± 40.0	0.9 ± 0.4	3.3 ± 3.3	128.0 ± 13.4	167.6 ± 25.3

Table 1: Mean ± EPM on behavior in resident-intruder paradigm. Attack latency time (ALT) (sec). Behavioral categories are expressed as percent of observation time (300 sec).

Figure 1: Effect of the pre-exposure to threatening situation (open field, OF; elevated plus-maze, EPM; rat exposure, Rat; or rat odor exposure, Odor) or not (Control) on the behaviors evaluated on the resident-intruder paradigm (n = 4-8 per group). * $P < 0.05$, Newman-Keuls test when compared to Control group; # $P < 0.05$, Newman-Keuls test when compared to other groups.

Figure 2: Evaluation of locomotion on open field test. (A) Number of crossing (counts) 24h before and 24h after resident-intruder paradigm of the groups submitted to pre-exposition to threatening situation (open field, OF; elevated plus-maze, EPM; rat exposure, Rat; or rat odor exposure, Odor) or not (Control). (B) Time (sec) in the central or peripheral area in the open field apparatus 24h after the RI paradigm. * $P < 0.05$, Newman-Keuls test when compared to the other groups. $n = 4-8$ per group.

Figure 3: Effect of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the Offence Score parameter evaluated on the resident-intruder paradigm ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0,0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 4: Effect of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the (A) Attack Latency ($p < 0.0001$) and (B) Rearing ($p = 0.0248$) parameters evaluated on the resident-intruder paradigm ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0.0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 5: Effect of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the (A) Inactivity ($p < 0.0001$) and (B) Social Exploration Score ($p < 0.0001$) parameters evaluated on the resident-intruder paradigm ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0.0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 6: Effect in the parameters evaluated on the resident-intruder paradigm (Ultrasonic vocalization record) of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the Offence Score ($p < 0.0001$) ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0,0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 7: Effect in the parameters evaluated on the resident-intruder paradigm (Ultrasonic vocalization record) of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the (A) Offensive Score ($p < 0.0001$) and (B) Rearing ($p = 0.0012$) ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0.0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 8: Effect in the parameters evaluated on the resident-intruder paradigm (Ultrasonic vocalization record) of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on the (A) Inactivity ($p < 0.0001$) and (B) Social Exploration Score ($p < 0.0001$) ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0.0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Figure 9. Effect in the Ultrasonic vocalization record protocol of the pre-exposition to stressful situation (Shock conditioning protocol) on (A) Number of events ($F_{4,39} = 14,61$; $P < 0.0001$) and (B) Total Duration parameters evaluated on the resident-intruder paradigm ($n = 8$ per group) in association with treatment (Saline, Drug 1 = Diazepam and Drug 2 = Apomorphine). * $P < 0,0001$, Newman-Keuls test present increased when compared to Baseline.

Reference List

- ABRAHAM, M. V.; ROBB, T. L.; HARE, J. F. Effect of hypoxia on opercular displays: Evidence for an honest signal? **Animal Behaviour**, v. 70, n. 2, p. 427–432, 2005.
- AGUIAR, L. M. et al. Tentativa de infanticídio por um macho dominante de *Alouatta caraya* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em um infante extra-grupo devido a influência do observador. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 4, p. 1201–1203, 2005.
- ALCOOK, J. **Animal Behavior: An Evolutionary Approach**. 10th Editi ed. [s.l: s.n.].
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, A. **Manual Diagnóstico e Estatístico De Transtornos Mentais - DSM-5**. [s.l: s.n.].
- ANTONIADIS, E. A.; MCDONALD, R. J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. v. 101, p. 1–13, 1999.
- ARCHER, J. The nature of human aggression. **International Journal of Law and Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 202–208, 2009.
- ARIAS-CARRIÓN, O. et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 1, p. 24, 2010.
- ARMBRUSTER, D. et al. The impact of sex and menstrual cycle on the acoustic startle response. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 326–333, 2014.
- BANNAI, M. et al. Anti-aggressive effects of agonists at 5-HT1B receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 2, p. 295–304, 2007.
- BASSI, G. S. et al. Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal gray as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. **Neuropeptides**, v. 41, n. 6, p. 365–74, dez. 2007.
- BEAUCHAINE, T. P.; GARTNER, J.; HAGEN, B. Comorbid Depression and Heart Rate Variability as Predictors of Aggressive and Hyperactive Symptom Responsiveness During Inpatient Treatment of Conduct-Disordered , ADHD Boys. v. 26, n. May 1999, p. 425–441, 2000.
- BENEDETTI, M. et al. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. **European journal of pain (London, England)**, v. 16, n. 6, p. 803–15, 2012.
- BLANCHARD, D. C. et al. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1243–1253, 2005.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, p. 43–68, 1988.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. What can animal aggression research tell us about human aggression? **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 3, p. 171–177, 2003.
- BLANCHARD, R. J. et al. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 5, p. 967–972, nov. 1991.
- BLANCHARD, R. J.; WALL, P. M.; BLANCHARD, D. C. Problems in the study of rodent aggression. **Hormones and Behavior**, v. 44, n. 3, p. 161–170, 2003.
- BOGERT, C. M.; ROTH, V. D. Ritualistic combat of male Gopher Snakes, *pituophis melanoleucus affinis* (reptilia, Colubridae). n. 1963, p. 1–28, 1956.
- BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant

- rodents : a tool for assessment of neurobehavioural development. v. 125, p. 49–56, 2001.
- BRANDÃO, M. L. et al. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 6, p. 863–875, 1999.
- BRANDÃO, M. L. **As Bases Biológicas do Comportamento. Introdução à Neurociência**. [s.l.: s.n.].
- BRONSTEIN, P. M. On the predictability, sensitization, and habituation of aggression in male bettas (*Betta splendens*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 108, n. 1, p. 45–57, 1994.
- BROWN, J. S.; KALISH, H. I.; FARBER, I. E. Conditioned Fear as Revealed by Magnitude of Startle Response to an Auditory Stimulus. **Journal of Experimental Psychology**, v. 41, 1951.
- BRUDZYNSKI, S. M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **Ilar J**, v. 50, n. 1, p. 43–50, 2009.
- BTASZCZYK, J.; TAJCHERT, K. Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 56, p. 919–925, 1996.
- CALCAGNOLI, F. et al. Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. **Psychopharmacology**, v. 229, n. 4, p. 639–651, 2013.
- CALCAGNOLI, F. et al. Acute and repeated intranasal oxytocin administration exerts anti-aggressive and pro-affiliative effects in male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 112–121, 2015.
- CAMPOS, K. F. C. et al. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey-predator interaction test. **Behavioural Brain Research**, v. 240, n. 1, p. 160–170, 2013.
- CANTERAS, N. S. et al. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 3, p. 297–305, 1997.
- CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 3, p. 481–491, 2002.
- CANTERAS, N. S.; MOTA-ORTIZ, S. R.; MOTTA, S. C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 321–327, 2012.
- CANTERAS, N. S.; RIBEIRO-BARBOSA, É. R.; COMOLI, E. Tracing from the dorsal premammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 661–668, 2001.
- CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 49–57, 2002.
- CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.
- CLEMENT, J. et al. Age-dependent changes of brain GABA levels, turnover rates and shock-induced aggressive behavior in inbred strains of mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 26, n. 1, p. 83–88, 1987.
- DAVIS, M. Pharmacological and Anatomical Analysis of Fear Conditioning Using the Fear-Potentiated Startle Paradigm. v. 100, n. 6, p. 814–824, 1986.
- DAVIS, M. et al. Fear-potentiated startle : a neural and pharmacological analysis. v. 58, p. 175–198, 1993.

- DE ALMEIDA, R. M. M. et al. Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1–3, p. 51–64, 2005.
- DE BOER, S. F. et al. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 288, n. 3, p. 1125–1133, 1999.
- DE BOER, S. F. et al. The neurobiology of offensive aggression: Revealing a modular view. **Physiology and Behavior**, v. 146, p. 111–127, 2015.
- DIEDERICH, N. J. et al. Parkinson Disease With Old-Age Onset: A Comparative Study With Subjects With Middle-Age Onset. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 4, p. 529–533, abr. 2003.
- EARLEY, C. J.; LEONARD, B. E. The effect of testosterone and cyproterone acetate on the concentration of γ -aminobutyric acid in brain areas of aggressive and non-aggressive mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 6, n. 4, p. 409–413, abr. 1977.
- EVANS, C. S. Display vigour and subsequent fight performance in the siamese fighting fish, betta splendens. **Behavioural Processes**, v. 11, n. 2, p. 113–121, 1985.
- FISCHER, J.; HAMMERSCHMIDT, K. Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders : insights. p. 17–27, 2011.
- FISH, E. W. et al. 5-HT_{1B} receptor inhibition of alcohol-heightened aggression in mice: Comparison to drinking and running. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 1, p. 145–156, 2008.
- FISH, E. W.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Escalated aggression as a reward: Corticosterone and GABA_A receptor positive modulators in mice. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 1, p. 116–127, 2005.
- FITZGERALD, P. Long-acting antipsychotic medication , restraint and treatment in the management of acute psychosis. n. November 1998, 1999.
- FRAGOSO, V. M. DA S. et al. Use of haloperidol and risperidone in highly aggressive Swiss Webster mice by applying the model of spontaneous aggression (MSA). **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 110–118, 2016.
- GAMMIE, S. C. et al. Neurotensin inversely modulates maternal aggression. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1215–1223, 2009.
- GAMMIE, S. C.; LEE, G. GABA_A receptor signaling in the lateral septum regulates maternal aggression in mice. v. 119, n. Pt 24, p. 5124–5136, 2010.
- GINSBURG, B.; ALLEE, W. C. Some effects of conditioning on social dominance and subordination in inbred strain of mice. v. 15, n. 4, p. 485–506, 2016.
- GIOVENARDI, M. et al. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology and Behavior**, v. 86, n. 1–2, p. 209–217, 2005.
- GLAZER, W. M.; DICKSON, R. A. Clozapine Reduces Violence and Persistent Aggression in Schizophrenia. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, n. suppl 3, p. 8–14, fev. 1998.
- GOTHELF, D.; APTER, A.; VAN PRAAG, H. M. Measurement of aggression in psychiatric patients. **Psychiatry Research**, v. 71, n. 2, p. 83–95, 1997.
- GOUVEIA JR, A. O conceito de modelo e sua utilização nas ciências do comportamento : breves notas introdutórias . The concept of model and your utilization in the behavioral sciences : introductory short notes. **Revista Estudos de Psicologia**, p. 13–16, 1999.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal Anxiety , panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 55 16, p. 3–6, 2007.

- GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in anxiety and panic. **Psychology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2010.
- GRIMES, J. M.; RICCI, L. A.; JR, R. H. M. Glutamic acid decarboxylase (GAD 65) immunoreactivity in brains of aggressive , adolescent anabolic steroid-treated hamsters. v. 44, p. 271–280, 2003.
- GRIMSLEY, J. M. S. et al. Contextual Modulation of Vocal Behavior in Mouse : Newly Identified 12 kHz “ Mid-Frequency ” Vocalization Emitted during Restraint. v. 10, n. March, p. 1–14, 2016.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651–658, 2012.
- GUALTIERI, C. T.; SCHROEDER, S. R. Pharmacotherapy for self-injurious behavior: Preliminary tests of the D1 hypothesis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 14, n. Supplement 1, p. S81–S107, jan. 1990.
- GUIMARÃES-COSTA, R. et al. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus . **Journal of Neuroscience Methods**, v. 165, n. 1, p. 25–37, 2007.
- HESS, W. R.; BRUGGER, M. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v. 1, p. 33–52, 1943.
- HO, H. P. et al. The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: An animal model of premenstrual irritability? **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 502–510, 2001.
- HOLLY, E. N.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Increased mesocorticolimbic dopamine during acute and repeated social defeat stress : modulation by corticotropin releasing factor receptors in the ventral tegmental area. p. 4469–4479, 2015.
- KENNEDY, J. S. et al. A current review of olanzapine’s safety in the geriatric patient: from pre-clinical pharmacology to clinical data. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, n. S1, p. S33–S61, dez. 2001.
- KINCHESKI, G. C. et al. The Dorsolateral Periaqueductal Gray and Its Role in Mediating Fear Learning to Life Threatening Events. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- KLEINDORFER, S.; FESSLE, B.; HOI, H. Avian nest defence behaviour: Assessment in relation to predator distance and type, and nest height. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 2, p. 307–313, 2005.
- KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological Bulletin**, v. 128, n. 6, p. 961–977, nov. 2002.
- KOCH, M. The Neurobiology of Startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 98, 1999.
- KOFLER, M. et al. Influence of gender on auditory startle responses. v. 921, p. 206–210, 2001.
- KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 22, p. 2007–2009, 2008.
- KOOLHAAS, J. M. et al. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 77, p. e4367, 2013.
- KOOLHAAS, J. M.; SCHURMAN, T.; WIEPKEMA, P. R. The organization of intraspecific agonistic behaviour in the rat. **Progress in Neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 247–268, 1980.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 155–

184, 2000.

LEUSSIS, M. P.; BOLIVAR, V. J. Habituation in rodents : A review of behavior , neurobiology , and genetics. v. 30, p. 1045–1064, 2006.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.

Psychopharmacology, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.

LIU, G.-X. et al. Reduced Aggression in Mice Lacking GABA Transporter Subtype 1.

Journal of neuroscience research, v. 85, n. 11, p. 2352–2359, 2007.

LUISA, M.; CRAWLEY, J.; RICCERI, L. Neuroscience and Biobehavioral Reviews

Ultrasonic vocalizations : A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. v. 33, p. 508–515, 2009.

MAGGIO, J. C.; WHITNEY, G. Ultrasonic Vocalizing by Adult Female Mice (*Mus musculus*). v. 99, n. 4, p. 420–436, 1985.

MANDEL, P. et al. Inhibitory amino acids, aggressiveness, and convulsions. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 29, p. 1–9, 1981.

MARTINEZ, R. C. R. et al. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse.

Behavioural Brain Research, v. 192, n. 2, p. 185–190, 2008.

MATOS, R. J.; PEAKE, T. M.; MCGREGOR, P. K. Timing of presentation of an audience: Aggressive priming and audience effects in male displays of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Behavioural Processes**, v. 63, n. 1, p. 53–61, 2003.

MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. DE; GOUVEIA JR, A. Comportamento de peixes : Vantagens e utilidades nas neurociências. 2006.

MCDUGLE, C. J. et al. A Double-blind, Placebo-Controlled Study of Risperidone in Adults With Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 633–641, jul. 1998.

MCGINNIS, M. Y.; VAKULENKO, M. Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. v. 80, p. 81–88, 2003.

MCGREGOR, A.; HERBERT, J. Differential effects of excitotoxic basolateral and corticomedial lesions of the amygdala on the behavioural and endocrine responses to either sexual or aggression-promoting stimuli in the male rat. **Brain Research**, v. 574, n. 1–2, p. 9–20, 1992.

MCGREGOR, P. K.; PEAKE, T. M.; LAMPE, H. M. Fighting fish *Betta splendens* extract relative information from apparent interactions: what happens when what you see is not what you get. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 6, p. 1059–1065, 2001.

MICZEK, K. A. et al. Aggression , anxiety and vocalizations in animals : GABAA and 5-HT anxiolytics. p. 38–56, 1995.

MICZEK, K. A. et al. Aggressive behavioral phenotypes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 167–181, 2001.

MICZEK, K. A. et al. Social and neural determinants of aggressive behavior: Pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and g-aminobutyric acid systems.

Psychopharmacology, v. 163, n. 3–4, p. 434–458, 2002.

MICZEK, K. A.; DE BOER, S. F.; HALLER, J. Excessive aggression as model of violence: A critical evaluation of current preclinical methods. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 3, p. 445–458, 2013.

MICZEK, K. A.; O'DONNELL, J. M. Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. **Psychopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 47–55, 1978.

- MOLES, A. et al. Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice : A possible index of sociability ? v. 182, p. 223–230, 2007.
- MOTTA, S. C. et al. Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4870–5, 2009.
- MOTTA, S. C. et al. Ventral premammillary nucleus as a critical sensory relay to the maternal aggression network. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 35, p. 14438–43, 2013.
- MOURA, L. M. et al. Morphine infusions into the rostralateral periaqueductal gray affect maternal behaviors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 899–905, 2010.
- NARVAES, R.; DE ALMEIDA, R. M. M. Aggressive behavior and three neurotransmitters: Dopamine, GABA, and serotonin—a review of the last 10 years. **Psychology and Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 601–607, 2014.
- NEHRENBURG, D. L. et al. An anxiety-like phenotype in mice selectively bred for aggression. v. 201, p. 179–191, 2009.
- NIKULINA, É. M.; KAPRALOVA, N. S. Role of Dopamine Receptors in the Regulation of Aggression. v. 41, n. 4, p. 364–369, 1991.
- NOBRE, M. J.; BRANDAO, M. L. Analysis of freezing behavior and ultrasonic vocalization in response to foot-shocks, ultrasound signals and GABAergic inhibition in the inferior colliculus: effects of muscimol and midazolam. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 1, p. 45–52, jan. 2004.
- NOBRE, M. J.; SANDNER, G.; BRANDÃO, M. L. Enhancement of acoustic evoked potentials and impairment of startle reflex induced by reduction of GABAergic control of the neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Hearing Research**, v. 184, n. 1–2, p. 82–90, 2003.
- NUNES MAMEDE ROSA, M. L. et al. Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. **Neuropsychobiology**, v. 51, n. 4, p. 248–55, 2005.
- NYBY, J. G. **Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology**. New York: CRC: Willott, J. F., 2001.
- ODUM, E. P. **Fundamentals of Ecology**. Eugene P. Odum. Saunders, Philadelphia, 1953. xii; 384 pp. [s.l: s.n.]. v. 120
- OLIVEIRA, R. F.; MCGREGOR, P. F.; LATRUFFE, C. Know thine enemy: getting to gather information from observing conspecific interactions. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 265, n. March, p. 1045–1049, 1998.
- OLIVIER, B.; MOS, J. I.; MICZEK, K. A. Ethopharmacological studies of anxiolytics and aggression. v. 1, p. 97–100, 1991.
- OLIVIER, B.; YOUNG, L. J. Animal Models of Aggression. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**, v. 118, 2002.
- PADOVAN, C. M.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: Influence of restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 325–330, 2000.
- PANKSEPP, J. B. et al. Affiliative Behavior , Ultrasonic Communication and Social Reward Are Influenced by Genetic Variation in Adolescent Mice. n. 4, 2007.
- PARMIGIANI, S.; FRANCESCO FERRARI, P.; PALANZA, P. An evolutionary approach to

- behavioral pharmacology: Using drugs to understand proximate and ultimate mechanisms of different forms of aggression in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 143–153, 1998.
- PEAKE, T. M.; MATOS, R. J.; MCGREGOR, P. K. Effects of manipulated aggressive “interactions” on bystanding male fighting fish, *Betta splendens*. **Animal Behaviour**, v. 72, n. 5, p. 1013–1020, 2006.
- PELLOW, S. et al. Predators are attracted to the olfactory signals of prey. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 5, n. 3, p. 1–4, 1985.
- PLAPPERT, C. F.; PILZ, P. K. D.; SCHNITZLER, H. Acoustic Startle Response and Habituation in Freezing and Nonfreezing Rats. v. 107, n. 6, p. 981–987, 1993.
- POTEGAL, M. et al. GABA Binding in the Brains of Aggressive and Non-Aggressive Female Hamsters. v. 247, p. 315–324, 1982.
- RAMIREZ, J. M. Animal models in the research of human aggression. **Aggression and Violent Behavior**, v. 5, n. 3, p. 281–290, 2000.
- RICCI, L. A. et al. Repeated cocaine exposure during adolescence alters glutamic acid decarboxylase-65 (GAD 65) immunoreactivity in hamster brain : correlation with offensive aggression. v. 1035, p. 131–138, 2005.
- ROSELL, D. R.; SIEVER, L. J. The neurobiology of aggression and violence. **CNS Spectrums**, n. MAY 2015, p. 1–26, 2015.
- SAITO, V. M.; BRANDÃO, M. L. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 180–186, 2015.
- SCATTONI, M. L. et al. Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T + tf / J Mouse Model of Autism. v. 3, n. 8, p. 48–52, 2008.
- SCHWARTZER, J. J.; RICCI, L. A.; JR, R. H. M. Interactions between the dopaminergic and GABAergic neural systems in the lateral anterior hypothalamus of aggressive AAS-treated hamsters. v. 203, p. 15–22, 2009.
- SIEGEL, A. et al. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. **Current neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 135–147, 2007.
- SIMLER, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; MANDEL, P. gamma-Aminobutyric acid in brain areas of isolated aggressive or non-aggressive inbred strains of mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 16, n. 1, p. 57–61, jan. 1982.
- SOARES, M. C. et al. Face your fears: Cleaning gobies inspect predators despite being stressed by them. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 3–8, 2012.
- SOMA, K. K. Testosterone and Aggression: Berthold, Birds and Beyond. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 99, n. January, p. e3, 2006.
- SOREFF, S. M.; HOUGH, M. G. Aggression. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2017.
- STAPLES, L. G. et al. Rats discriminate individual cats by their odor: Possible involvement of the accessory olfactory system. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1209–1217, 2008.
- STORBECK, J.; CLORE, G. L. On the interdependence of cognition and emotion. **Cognition and Emotion**, v. 21, n. 6, p. 1212–1237, 1 set. 2007.
- STORK, O. et al. Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65. v. 865, p. 45–58, 2000.

- TAKAHASHI, L. K.; THOMAS, D. A.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)**, v. 97, n. 3, p. 207–212, set. 1983.
- THOMAS, D. A.; TAKAHASHI, L. K.; BARFIELD, R. J. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)**, v. 97, n. 3, p. 201–206, set. 1983.
- TWARDOWSCHY, A. et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae). **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, p. 1149–59, 2013.
- URIBE-MARIÑO, A. et al. Anti-aversive effects of cannabidiol on innate fear-induced behaviors evoked by an ethological model of panic attacks based on a prey vs the wild snake *Epicrates cenchria crassus* confrontation paradigm. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 412–21, 2012.
- VAN KAMPEN, H. S. Violated expectancies: Cause and function of exploration, fear, and aggression. **Behavioural Processes**, v. 117, p. 12–28, 2015.
- WAAL, F. B. M. DE. What is an animal emotion ? v. 1224, p. 191–206, 2011.
- WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic Effects of High Illumination Levels Assessed with the Acoustic Startle Response in Rats. v. 3223, n. 96, 1997.
- WALLACE, B. Ritualistic Combat and Allometry. v. 36, n. 3, p. 627–652, 2014.
- WESSON, D. W. Sniffing behavior communicates social hierarchy. **Current Biology**, v. 23, n. 7, p. 575–580, 2013.
- WILLEY, A. R.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Social interactions and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. v. 202, p. 122–129, 2009.
- WILLIAMS, W. O.; RISKIN, D. K.; MOTT, K. M. Ultrasonic Sound as an Indicator of Acute Pain in Laboratory Mice. v. 47, n. 1, p. 8–10, 2008.
- YANG, M. et al. The rat exposure test: A model of mouse defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 465–473, 2004.