

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -**

**UNESP**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PIPGCF UFSCar/UNESP**

**JEIMMY MARION PENAGOS GIL**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS**

**AO TESTE DE AVERSÃO CONDICIONADA AO CONTEXTO**

**INDUZIDA PELA INTERAÇÃO SOCIAL AGRESSIVA**

Araraquara, SP

-2018-

**JEIMMY MARION PENAGOS GIL**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS  
AO TESTE DE AVERSÃO CONDICIONADA AO CONTEXTO  
INDUZIDA PELA INTERAÇÃO SOCIAL AGRESSIVA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como requisito para obtenção do Título de mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**


Araraquara, SP

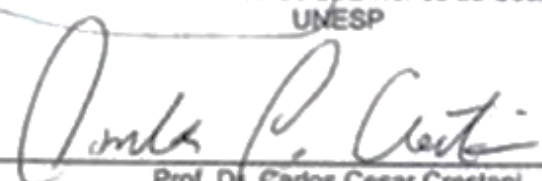
-2018-

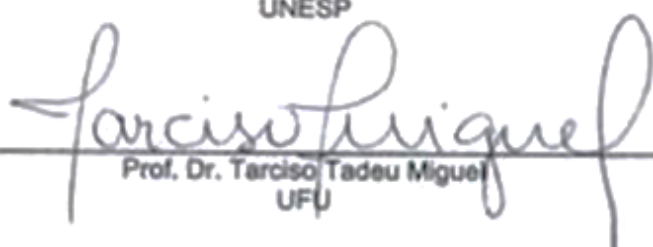


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jeimmy Marion Penagos Gil, realizada em 18/09/2018:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Leiz Nunes de Souza  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel  
UFU

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e amigos, Estella e Edgar, a minha prima Ivone, por serem meu pilar, por me apoiarem incondicionalmente nas minhas escolhas e acreditarem em mim; pela ajuda e apoio econômico, político e afetivo; por serem meus amigos e eu poder contar com eles neste tempo, devo para eles o compromisso com a vida, por me darem força para ter valentia e confiança nos momentos que precisei. Para eles dedico todas as minhas conquistas, em nome do amor que sempre nos une.

Ao meu orientador, Professor Ricardo, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo, por seu bom humor, grande paciência, por ser meu guia nesse processo e compartilhar sua experiência, por me acolher e ser parte importante da minha família brasileira. Me sinto muito grata com a vida, por conhecer uma pessoa que acredita na evolução da educação e transmite esse amor pela neurociência.

O Javier Rico, por ser amigo e tutor, por me orientar desde o começo, por suas observações e interesse no meu trabalho, por ser meu exemplo acadêmico a seguir. Gratidão por apresentar a neurociência como forma de vida e acreditar nossas capacidades para empreender este caminho na academia.

A Ana e Nathália, por seu tempo, paciência e sua experiência na construção deste trabalho. Ao grupo de trabalho, Diego, Matheus, Gabriel, Lucas Canto, Beatriz e Tatiani, pela ajuda e por fazer mais leve meu aprendizado neste processo, pelas discussões e para construir este trabalho.

A todos meus amigos farmacólogos obrigada por me acolherem não só academicamente, mas também por se tornarem minhas famílias nestes anos. Acredito que achei grandes amigos para a vida. Especialmente minha grande amiga e alma gêmea brasileira, Nathália, obrigada pelas risadas, viagens, conversas, broncas, conselhos, por ser a minha amiga e colega de trabalho, sou grata por estar e permanecer neste processo.

Aos colegas e amigos do laboratório e ao meu grupo de trabalho do Programa de Pós-graduação, em especial Paula, Celina, Lucas Gomes, Leandro, Lucas Barreto, Ricardo, Lígia, Gessynger, Carlão, Rodrigo, Willian, pela amizade, por fazer mais leve os dias de trabalho neste processo, por fazerem leves e divertidos os dias, pelas boas conversas e pelos conselhos e auxílios.

À Tirene, por sua amizade, pelas risadas, suas divertidas conversas, especialmente as conversas de política e viagens; obrigada pelo suporte na área administrativa.

A Rosana Pupim e Elisabete Lepera, pessoas extraordinárias e dedicadas, por sua ajuda e apoio técnico e suporte em todos os momentos.

A Marina Straci, por seu amor incondicional, seu apoio em todo momento, por ser parte deste processo, por suas músicas e sua voz que deram amor e tranquilidade a meus dias. Por estar na minha vida, obrigada.

A meus grandes amigos Aura, Anderson por empreenderem nesta linda viagem juntos, a meus amigos Ana, Fernanda, Paulo, Bahia, Brayan, Luis, Gabi, Juli, por serem minha família nos primeiros anos, pelas risadas nos finais de semana e nos momentos de angústia, oferecerem uma companhia, obrigada pelas risadas e viagens juntas.

A Alice, Marina por nossas tardes de rolê e amizade. A Mariana e Bruna por me receberem no seu lar e me deixarem ser parte deste lindo lar que o contribuí com risadas, jantas e companhia, paz neste processo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Marcelo, Carlos e Cleopatra.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos e auxílio na parte administrativa, pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, com um profundo respeito agradeço, ofereço minhas desculpas e agradeço às suas vidas porque sem elas este projeto não seria possível.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.

## RESUMO

Roedores expostos ao estresse de derrota social exibem respostas hormonais, comportamentais e autonômicas denominadas reações de defesa. Este estudo buscou realizar uma validação comportamental de um teste de aversão ao contexto gerada por derrota social. Noventa e oito camundongos Suíços albinos machos foram habituados por 10 minutos durante três dias consecutivos a um aparato contendo uma toca ligada a um túnel, o qual leva a uma superfície com duas partes iguais divididas por uma tela de arame: Superfícies A (local das interações sociais com contato físico) e superfície B (local das interações sociais sem contato físico). A toca, o túnel e a Superfície A são separados entre si por portas-guilhotina. Do 4º ao 7º dia, os animais foram distribuídos em: (a) grupo controle (expostos à interação social com coespecíficos não agressores), (b) grupo derrotado (expostos à interação social com um coespecífico dominante). Nestas interações, um camundongo agressor ou não agressor era colocado na superfície B separado do outro animal pela tela de arame por 5 minutos, seguida de derrota social ou interação não agressiva na superfície A por 3 minutos e, em seguida, os agressores ou não agressores eram colocados na superfície B por mais 5 minutos. Seguindo o mesmo protocolo, porém em um novo contexto (caixa de interação social com o coespecífico), o grupo (c) controle - novo contexto (interação social com coespecífico não agressor), e o grupo (d) derrotado - novo contexto (interação social com um coespecífico dominante). No 8º dia, todos os animais foram individualmente re-expostos ao aparelho por 10 minutos, sem a presença do coespecífico, porém contendo uma porção da maravalha da sua gaiola de alojamento do agressor ou do não agressor. No terceiro dia de Habituação e no dia da reexposição, as seguintes medidas foram registradas: frequência de entradas e tempo gasto na toca, túnel e superfície A; frequência e tempo de levantamentos e de grooming; tempo total de SAP e tempo de escavar na superfície. Quando comparados à fase de habituação, no oitavo dia o grupo derrotado teve uma diminuição de levantamentos, do tempo de permanência na superfície A e de escavar a maravalha, bem como aumento na frequência e no tempo de grooming na toca e na frequência de esticadas SAP total. A análise dos resultados não revelou quaisquer sinais de evitação ao ambiente nos animais do grupo controle, grupo derrotado-novo contexto ou grupo controle-novo contexto. Nossos resultados mostraram que o emprego de quatro derrotas sociais antecedidas por ou seguidas de exposição sensorial (porém, sem contato físico) ao oponente agressor provoca aversão condicionada ao contexto do embate.

**Palavras Chaves:** Derrota social, aversão contextual, medo contextual, pistas ambientais, condicionamento, interação agressiva.

## ABSTRACT

Rodents exposed to social defeat stress exhibit hormonal, behavioral, and autonomic responses called defense reactions. This study sought to conduct a behavioral validation of a context aversion generated by social defeat test. Ninety-eight male albino Swiss mice were habituated for 10 minutes for three consecutive days to an apparatus, containing a tunnel-bound burrow, which leads to a surface (divided by a wire mesh) that has two parts of the same dimensions : Surfaces A (site of social interactions with physical contact) and surface B (location of social interactions without physical contact). The burrow, the tunnel and the surface A are separated from each other by guillotine doors. From the 4th to the 7th day, the animals were distributed in: (a) control group (animals exposed to social interaction with non-aggressive conspecific), (b) defeated group (animals exposed to social interaction with a dominant conspecific), exposed to 5 minutes of sensory interaction. In this interaction an aggressor or non-aggressor mouse was placed on surface B separated from the other animal by the wire mesh, followed by social defeat or non-aggressive interaction on surface A for 3 minutes. Subsequently, aggressive or non-aggressive animals were placed on surface B for a further 5 minutes, to the adapted test of interaction with the conspecific (same context where they were habituated). Following the same protocol, but in a new context (social interaction box), group (c) control - new context was exposed to social interaction with a non - aggressive conspecific, and group (d) defeated - new context was exposed to interaction with a dominant co-specific. On the eighth day, all animals were individually exposed to the Adapted test of interaction with the conspecific for 10 minutes, without the presence of the conspecific, but containing a portion of the sawdust of their housing cage. On the third day of Habituation and on the Day of Reexposure, the following measures were recorded: frequency of entrances and time spent in the burrow, tunnel and surface A; frequency and time of rising and grooming; SAP total time and time to dig on the surface. When compared to the Hab stage, on the eighth day the GD had a decrease of rising, the permanence time on surface A and excavation of the sawdust, as well as increase in the frequency and time of grooming in the burrow and in the frequency of total SAP stretched. Analysis of the results did not reveal any signs of environmental avoidance in GC, GDn or GCn animals. Our results showed that the use of four social defeats preceded by or followed by sensory exposure to the aggressor opponent causes aversion conditioned to the context of the clash.

**Key words:** Social defeat, contextual aversion, contextual fear, environmental cues, conditioning, aggressive interaction.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Teste de interação com o coespecífico
- Figura 2 - Caixa de interação social com o coespecífico
- Figura 3 - Tempo e frequência de entradas nos compartimentos. Exp. 1
- Figura 4 - Frequência e tempo de grooming. Exp. 1
- Figura 5 - Frequência de SAP total e tempo de escavar. Exp. 1
- Figura 6 - Frequência de levantamentos. Exp. 1
- Figura 7 - Tempo e frequência de entradas nos compartimentos. Exp. 2
- Figura 8 - Frequência e tempo de grooming. Exp. 2
- Figura 9 - Frequência de SAP total e tempo de escavar. Exp. 2
- Figura 10. - Frequência de levantamentos Exp. 2
- Figura 11 - Tempo de permanência de animais expostos a maravalha nova ou familiar



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Area tegmentar ventral
DSM-V	Quinta versão do Manual de Estatística e Diagnóstico de Doenças Mentais[ do inglês - <i>DiagnosticandStatistical Manual of Mental Disorders V</i> ]
GC	Grupo controle
GCn	Grupo controle- novo contexto
GD	Grupo derrotado
GDn	Grupo derrotado- novo contexto
Hab	Habituação
HM	Hipotálamo medial
NAc	Núcleo accumbens
OMS	Organização Mundial da Saúde
ReE	Reexposição
RET	Test de exposição ao rato [do inglês, <i>ratexposuretest</i> ]
SAP	Esticadas [do inglês - <i>stretchedattendposture</i> ]
SCA	Sistema cerebral de aproximação
SFLC	Sistema fuga/luta/congelamento
SIC	Sistema de inibição comportamental
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
1,1 Ansiedade.....	12
1.2. Ansiedade e Modelos Animais.....	14
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>19</b>
3.1. Animais.....	19
3.1.1 Escolha do Agressor.....	19
3.2. Equipamento.....	20
3.2.1 Teste adaptado de interação com o coespecíficos.....	21
3.2.2 Caixa de interação social com o coespecífico.....	21
<b>3.3. Protocolos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1. Experimento 1. . Avaliação comportamental de camundongos antes (habituação) e após (Re-Exposição ao contexto) as interações não agressiva (situação controle) e agressiva (derrota social).....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2. Experimento 2. Avaliação comportamental de camundongos antes (Habituação) e após (Re-Exposição) interações não agressivas (controle) ou agressivas (derrota social) ocorridas em outro ambiente.....</b>	<b>23</b>

3.4.	Análise estatística.....	25
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>Experimento 1.</b> Exposição extensa de camundongos ao teste adaptado de interação com o coespecíficos, com reexposição no local derrotado.....	25
<b>4.2.</b>	<b>Experimento 2.</b> Exposição extensa de camundongos à caixa de interação social, com reexposição em um contexto no qual não foi derrotado (Teste adaptado de interação com o coespecíficos).....	32
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>42</b>
	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>43</b>
	<b>Anexo 1.....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Ansiedade

A ansiedade pode ser definida como um estado emocional qualificado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sentimento de apreensão, insegurança, (NUTT, 1990), seguido de um repertório de respostas comportamentais e autonômicas (ex.: liberação de hormônios e neurotransmissores), que preparam o organismo para responder a uma possível ameaça ao organismo (ALBARRACIN et al., 2008). Estas respostas têm uma relevância adaptativa, favorecendo a execução de condutas de sobrevivência do indivíduo (PRATT, 1992; GRAEFF, 1999a, GRAEFF, 1994b; GRAEFF e GUIMARÃES, 2012c). Embora a ansiedade seja um conjunto de respostas que aumentam atenção e faça com que melhore desempenho nas tarefas cotidianas, pode se tornar mal adaptativa, quando estas respostas são apresentadas frente estímulos que não apresentem um perigo, causando mal-estar no indivíduo e mudanças no desempenho das tarefas habituais, tornando-se uma condição patológica (PRATT, 1992; BRANDÃO, 2001).

De acordo com a quinta versão do Manual de Estatística e Diagnóstico de Doenças Mentais (DSM-V, do inglês Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria, o medo é a resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida, enquanto a ansiedade é caracterizada como estado emocional desagradável, subjetivamente negativo, orientada a identificar eventos futuros que tenha potenciais sinais de perigo, mas sem que se tenha controle ou previsão da ameaça; é à ansiedade é uma resposta antecipada da ameaça futura (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, (2014); ALBARRACIN, et al., (2008); BARLOW, (2002); MINEKA; OEHLBERG, (2008); PRATT,(1992)). O DSM-V classifica a ansiedade em diferentes transtornos, como ansiedade generalizada, fobias específica, agorafobia ou transtorno de ansiedade social entre outras. Por exemplo, a ansiedade social é caracterizada por medo ou ansiedade intensa que aparece em relação a situações sociais nas quais a pessoa é exposta ao possível julgamento por outros, temendo mostrar sintomas de ansiedade que podem ser avaliados negativamente pelos observadores.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que o 3,6% da população mundial apresentava ansiedade em 2015, além de mostrar uma maior prevalência em mulheres com 4,6% em comparação com os homens (2,6%). A OMS também estimou que o continente com maior quantidade de casos registrados é no sudeste asiático, com 23 %, seguido das Américas, com 21% dos casos totais. Dentro das Américas, o Brasil, em 2015, foi o país com maior

número de casos, com 9,3% da população total diagnosticados com transtorno de ansiedade (Organização Mundial da Saúde, (2017)). A alta prevalência de transtornos de ansiedade, tem promovido inúmeras pesquisas com a finalidade de compreender sua base neurofisiológica (SORREGOTI et al., 2018; FARIA et al., 2016; GUIMARÃES et al., 1991) e realizar análises farmacológicas pré-clínicas, como potenciais tratamentos, permitido o desenvolvimento de protocolos de classificação diagnóstica, como o DSM-V.

Segundo Darwin (1872), em seu livro "A expressão das emoções no homem e nos animais", o homem compartilharia com seus ancestrais algumas respostas emocionais básicas. Posteriormente, uma série de estudos conduzidos por Blanchard e colaboradores (1991b) mostraram evidências de que estados de ansiedade em humanos apresentam correlações com os mecanismos de defesa de animais diante de estímulos ameaçadores ou situações de perigo (BRAGA, 2010). Blanchard e colaboradores (1993c) propuseram os conceitos de distância defensiva, em que as estratégias de defesa eliciadas dependem da fonte de perigo (se real ou potencial) e da rota de fuga [se distante (fuga ou congelamento) ou próxima (luta)]. McNaughton e Gray, nos anos 2000, propuseram o sistema de modulação comportamental, composto por diferentes estruturas encefálicas hierarquicamente distribuídas, controlando as respostas do organismo e tem como base comportamental os princípios de condicionamento clássico pavloviano, em que as respostas condicionadas são o resultado da associação entre um estímulo neutro (que naturalmente não evoca respostas fisiológicas e comportamentais) e um estímulo incondicionado (que produz respostas inatas no sujeito) (RODGERS, et al., 1997a).

Neste ponto, o sistema de modulação comportamental é integrado por três sistemas encefálicos fundamentais, o sistema fuga/luta/congelamento (SFLC), e o sistema cerebral de aproximação (SCA) e o sistema de inibição comportamental (SIC), (McNAUGHTON; GRAY, 2000). O SFLC está relacionado com estímulos de punição, emitindo comportamentos de esquiva do estímulo, como congelamento, fuga ou luta. Estas respostas são moduladas por estruturas que estão nos extremos do eixo rostro-caudal como amígdala, hipotálamo medial (HM) e matéria cinzenta periaquedutal do mesencéfalo (MCP) (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015; KEENEY et al., 2014), além de estimular o córtex e estruturas adrenais a sintetizarem e secretarem glicocorticóides (cortisol, em humanos; corticosterona, em roedores), os quais têm um papel importante por promoverem ações catabólicas em seus tecidos alvos, aumentando a disponibilidade energética para o desenvolvimento de respostas frente ao estímulo/situações aversivas (GRAEFF; HETEM, 2004d).

Á ativação do sistema de inibição comportamental (SIC), está envolvido o sistema septo-hipocampal, relacionado com o aspecto cognitivo, provocando inibição de motor, além de aumentar seu nível de vigilância e atenção (GRAEFF; HETEM, 2004) a amígdala, relacionada com os aspectos neurovegetativos da ansiedade e o córtex pré-frontal (McNAUGHTON e GRAY, 2000; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015)

Já no sistema cerebral de aproximação (SCA), proposto por McNaughton e Gray (2000), é ativo como resposta da ativação do SIC e do SFLC, produzindo um conflito de aproximação ou evitação do estímulo, gerando desse jeito, ansiedade, seria o encarregado de dirigir o animal a recompensas ou a omissão da punição, tem como objetivo, satisfazer demandas biológicas, como a procura por alimento ou por sexo, e também permite a discriminação de ambientes que estejam relacionados com recompensa ou punição, optando pela proteção do organismo de possível dano. Tem sido estudado neste sistema o papel da via dopaminérgica mesolímbica, composta principalmente pelo sistema dopaminérgico na área tegmentar ventral (VTA), e as suas projeções até o núcleo accumbens (NAc) (BERTON e t al., 2006).

## **1.2. Ansiedade e Modelos Animais**

Nos estudos da neurobiologia da ansiedade têm sido utilizados modelos animais, com destaque para os com roedores, como ratos e camundongos, que se baseiam em respostas comportamentais condicionadas e incondicionadas. Modelos de medo condicionado têm sido ferramentas muito importantes para o estudo da neurobiologia das emoções e da expressão de medo em indivíduos humanos e não humanos (GILMARTINI; BALDERSTON; HELMSTETTER, 2014). Especificamente, os modelos animais de condicionamento aversivo são geralmente caracterizados pelo uso de estímulos pouco comuns no entorno ecológico das espécies utilizadas, por exemplo, os choques elétricos administrados nas patas (CARLSON et al., 1993), esquiva ativa/passiva ou testes de conflito, aversão condicionada ao sabor (CURRAN, K. P.; CHALASANI, 2012; RODGERS et al., 1997a; QUINN e FANSELOW 2006; MINEKA e OEHLBERG, 2008). Isso leva à busca por estímulos com características mais etológicas ou incondicionadas, como exposição ao campo aberto, labirinto em cruz elevado, exploração livre (RODGERS et al., 1997a), interações residente-intruso (COOPER et al. 2017), exposição ao predador (PERROT-MINNOT; BANCHETRY; CÉZILLY 2017) e a aversão ao contexto causada por um confronto com um predador. Por exemplo, por meio de um protocolo com características etológicas, envolvendo respostas não condicionadas e

programadas filogeneticamente, exibidas por ratos diante de estímulos olfativos do predador (gato), Staples (2010) observou a manifestação de respostas defensivas, como congelamento e a expressão da proteína FOS em estruturas como o núcleo leito da estria terminal, área septal lateral ventral e núcleo paraventricular do hipotálamo (LEDOUX, 2014; ARMÁRIO; ESCORIHUELA; NADAL, 2008).

Em contrapartida, sabe-se que, em seu ambiente natural, os roedores têm uma formação social hierarquicamente estruturada (CROWCROFT; ROWE, 1963), integrada por sujeitos dominantes, que exibem comportamentos agressivos. Estudos prévios têm demonstrado que roedores machos, que exibem respostas comportamentais agressivas quando são expostos a coespecíficos do mesmo sexo, inibem comportamentos agressivos dos coespecíficos, provocando aumento das respostas de submissão, em que movimentos de agressão são substituídos por de defesa ativa (ex., andar para trás) ou passiva (ex., congelamento), além de também levarem a diminuição de locomoção e à perda de peso (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1994). Neste sentido, o paradigma de derrota social, como o conflito entre coespecíficos, estabelece uma relação dominante-subordinado (TOTH; NEUMANN, 2013; DE BOER, 2018).

Nesse sentido, o interesse por estabelecer protocolos em que os animais exibem um repertório vasto de comportamentos tem a finalidade de estudar vias de sinalização e fármacos que alteram desde medidas mais robustas como as espaço-temporais, até outras mais sutis, como comportamentos de avaliação de risco. Além da importância do nível de estresse basal na expressão de tais comportamentos, tem sido sugerido que a exposição crônica ao estresse de naturezas diversas repercute no aparecimento de comportamentos relacionados com ansiedade ou medo. Por exemplo, roedores submetidos ao estresse crônico apresentam reações defensivas potencializadas quando expostos a estímulos aversivos (FRANKLIN et al., 2017; VENZALA et al., 2012; RAZZOLI, et.al., 2011; LUMLEY, et.al., 2000; LUKAS, 2011).

Dessa forma, uma experiência de derrota parece ser relevante para a ativação de mecanismos de defesa antecipatórios, criando uma associação entre um estímulo aversivo e um estímulo sem valor emocional, que posteriormente provoca novas respostas de medo, como a inibição comportamental (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1994; RODGERS; RANDALL 1986b; FANSELOW, 1994). Isto demonstra ser um modelo importante para o estudo de mecanismos relacionados com a ansiedade. De forma complementar, De Oliveira Crisanto et al. (2015) verificaram uma ativação neuronal no circuito hipotalâmico similar em

camundongos Suíços albinos ao serem expostos a pistas olfativas de gato. Da mesma forma, tem sido estudado e demonstrado no TER (teste em que o camundongo é exposto ao predador (rato), validado por Yang et al. (2004), que este modelo é eficaz em mostrar comportamentos como avaliação de risco. Tal como no modelo presa-predador em que o rato é exposto ao gato, a exposição de camundongos ao rato (no TER) resulta na ativação do sistema hipotalâmico de defesa (MARTINEZ et al., 2008). Ao lado disso, os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao TER respondem ao tratamento com fármacos ansiolíticos e ansiogênicos (CAMPOS et al., 2013; VARMAN e RAJAN, 2015; LORIVEL ; ROY e HILBER, 2014).

Os resultados de um estudo prévio realizado em nosso laboratório (CRESTANI, 2015), mostraram que as medidas espaço-temporais (entradas e tempo de permanência nos diferentes compartimentos do aparato) não foram afetadas com um único episódio de conflito entre coespecíficos. Por outro lado, houve um aumento significativo do grooming (comportamento de auto-limpeza) na toca apresentado pelo grupo derrotado socialmente, sugerindo um aprendizado associativo em que a toca figuraria um local seguro para a expressão desse comportamento. Neste mesmo estudo, os autores sugerem alternativas para tornar o protocolo de derrota social mais robusto, como aumentar o número de encontros agressivos ou adicionar mais pistas ambientais, para facilitar a aprendizagem contextual. Já em um paradigma baseado na derrota social com pistas olfativas, como a presença da maravalha do agressor, De Oliveira (2015) demonstrou que o odor da maravalha do agressor é suficiente para que os animais apresentem medo contextual, com efeito em medidas espaço-temporais (tais como tempo de permanência) no contexto onde o animal foi atacado.

Com a finalidade de gerar medo ao contexto, diversos estudos têm proposto ajustes metodológicos relacionados à conduta social de roedores expostos a interações agressivas. Por exemplo, Meduri, Farnbauch e Jasnow, (2015) e Dulkaet al. (2015) submeteram camundongos C57Bl/j quatro vezes ao dia, por dois dias consecutivos, à interação social física por 5 minutos, seguida por 55 minutos de interação sensorial (exposição ao agressor sem contato físico) e, após 24 horas, quando os sujeitos foram expostos ao teste de interação social, houve evitação da investigação social. Já Favoretto, Macedo e Quadros (2017) expuseram camundongos Suíços às derrotas episódicas por 10 dias, no paradigma residente-intruso, onde cada ensaio tinha 5 minutos de estresse sensorial, um período de 5 minutos de interação física e finalmente 5 minutos de estresse sensorial, observando que o contato sensorial (antes e depois da derrota social) mostra-se suficiente para promover déficits sociais de longo prazo no



teste de investigação social.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como hipótese que um protocolo baseado na derrota social, com número maior de confrontos entre coespecíficos, acrescido de interação sensorial (exceto o físico), é capaz de gerar aprendizagem associativa, bem como se o uso de pistas ambientais neste contexto favorece a aversão contextual. Dessa forma, pretendemos padronizar e validar em nível comportamental o emprego de um protocolo no qual seja possível mensurar aversão ao contexto tanto por meio de medidas espaço-temporais [como tempo de permanência no local aversivo (local de interação agressiva)], quanto por meio de medidas complementares, como grooming ou aquelas relacionadas à avaliação de risco.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Verificar se um número maior de confrontos físicos, baseado em um protocolo de derrota social, acrescido de interação sensorial entre coespecíficos sem contato físico, é capaz de gerar aversão condicionada ao contexto.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar as respostas comportamentais de animais re-expostos ao mesmo contexto onde foram derrotados, avaliando se há associação aprendizagem associativa erando aversão contextual.

Avaliar se a derrota social provoca aversão generalizada a ambientes não pareados com a agressão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 108 camundongos Suíços albinos machos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Oitenta e um camundongos (25-35g) foram considerados sujeitos experimentais e alojados em caixas-moradias (41 cm x 34 cm x 16 cm) em grupos de 10 indivíduos. Doze camundongos, considerados coespecíficos não agressores (25-35g), moraram na caixa moradia dos sujeitos experimentais e foram utilizados para as interações não agressivas. Dez animais foram utilizados para o treinamento prévio dos agressores e Vinte animais (47–73 g) foram considerados como dominantes e utilizados nas interações agressivas.

Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00), com acesso ao alimento e a água a vontade - *ad libitum*, exceto durante os curtos períodos de teste. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, protocolo CEP/FCF/CAr nº 40/2016, o qual cumpre as diretrizes brasileiras e internacionais para o uso e o bem-estar dos animais.

##### 3.1.1 Escolha do Agressor

No período de habituação às condições do biotério local do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, um observador identificou os camundongos considerados coespecíficos dominantes (definido como o sujeito que exhibe comportamentos espontâneos de agressão) (ROBAYO, 2013), 20 animais foram isolados em caixas moradia individuais (28 x 17x 12 cm) por, no mínimo, 4 semanas. O método de isolamento foi feito para intensificar o comportamento agressivo, tal como descrito por Valzelli (1985) e Engler et al. (2005), igualmente foi escolhido por ter sido utilizado anteriormente no laboratório de neuropsicológica demonstrado ser um método efetivo para aumentar os comportamentos agressivos.

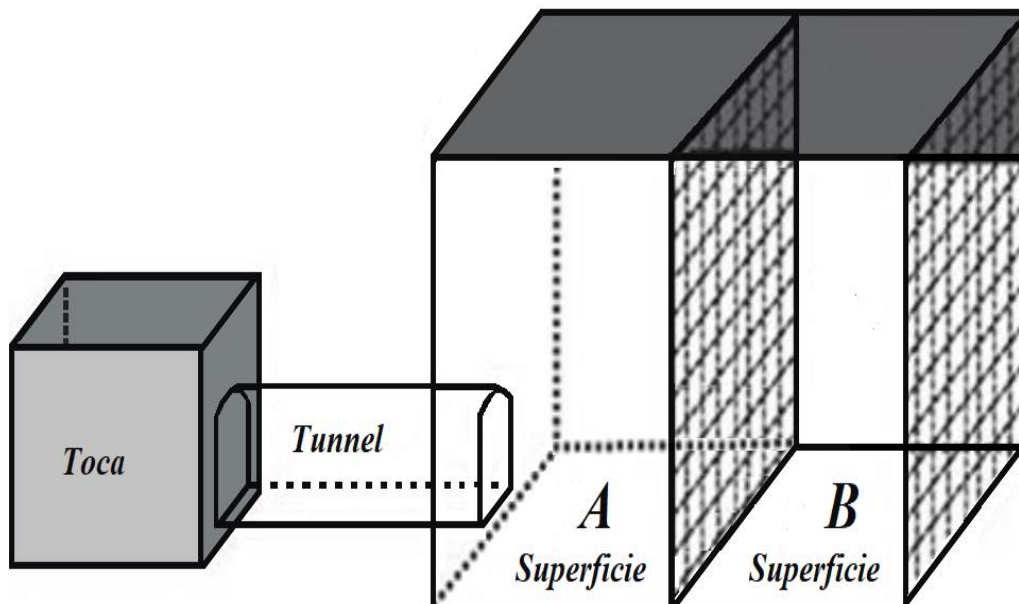
A caixa dos animais agressivos (em isolamento) era limpa a cada 20 dias, garantindo que na semana de experimento a maravalha tivesse o cheiro do agressor. Os animais foram treinados como parâmetros de escolha do agressor passaram no mínimo por duas interações agressivas com um conespecifico não agressor (10 conespecificos não

agressores utilizados só para treinamento do agressor) um dia antes do ensaio experimental, sendo escolhidos aqueles com latência de até 30 segundos para emissão da primeira mordida [contato do focinho do agressor com o corpo do coespecífico, exibindo movimentos maxilares e introduzindo os dentes através da pele do coespecífico (ROBAYO, 2013)]. Vinte e quatro horas antes do confronto com os sujeitos experimentais. O primeiro dia de interação, os agressores foram habituados por 20 min ao aparelho experimental antes de fazer as interações.

## 3.2 EQUIPAMENTO

### 3.2.1 Teste adaptado de interação com os coespecíficos

O aparato experimental utilizado no experimento 1 (Figura 1) é Adaptado do teste de interação com o coespecífico (CRESTANI; CIPRIANO; NUNES-DE-SOUZA, 2017), que por sua vez é uma adaptação do teste de exposição ao rato [do inglês, *rat exposure test* – RET (YANG et al., 2004)]. Este aparato foi escolhido por sua praticidade na hora de fazer observação de diferentes comportamentos além das medidas clássicas de locomoção. Igualmente, este aparelho foi escolhido em comparação com o teste de preferência por um lugar, por suas dimensões, especificamente as dimensões da toca, este local ao ser menor que a superfície de interação, oferece maior proteção para ao camundongo.



**Figura 1 - Teste de interação com o coespecífico.** Esquema do aparelho com os diferentes compartimentos, utilizado para o modelo de aversão ao contexto gerado por interação agressiva. Adaptado a partir do “teste de exposição ao rato” validado por Yang et. al (2004). (modificado de CRESTANI e colaboradores 2017).

O aparato tem uma toca (7 x 7 x 12 cm) ligada a um túnel (4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e 1,5 cm acima do assoalho) que leva à uma superfície dividida em duas partes por uma divisória de metal pela qual os sujeitos-teste têm acesso, por meio do olfato, audição e visão, aos sinais sensoriais do coespecífico não agressivo ou agressivo. As medidas da superfície foram reduzidas na metade do RET, garantindo a confrontação entre os conespecíficos num menor tempo, diminuindo o tempo de exploração do aparelho. Para separação dos compartimentos há portas-guilhotina. As medidas da superfície foram reduzidas na metade em comparação das utilizadas no protocolo validado por Yang, com a intenção de aumentar a probabilidade de interação social. Sendo as dimensões da superfície: superfície A (11,5 x 12 x 10,5), onde ocorriam as interações sociais agressivas e não agressivas, e superfície B (11,5 x 12 x 10,5), compartimento de alocação dos coespecíficos agressivos ou não agressivos antes ou após cada interação na superfície AA experiência de convivência com o animal agressivo colocado na superfície B tem como finalidade ser uma forma de estresse psicológico ao animal teste, uma vez que não permite contato físico direto entre os animais.

### 3.2.2 Caixa de interação social

O aparato experimental utilizado no protocolo 2 (Figura 2) é uma caixa de interação social, com uma superfície dividida em duas partes por uma divisória de metal pela qual os sujeitos-teste têm acesso, por meio do olfato, audição e visão, aos sinais sensoriais do coespecífico não agressivo ou agressivo. As quatro paredes e o chão do aparelho são de cor branca e as dimensões da superfície são: superfície A (11,5 x 12 x 17), onde ocorriam as interações sociais agressivas e não agressivas, e superfície B (11,5 x 12 x 17), compartimento de alocação dos coespecíficos agressivos ou não agressivos antes ou após cada interação na superfície A.

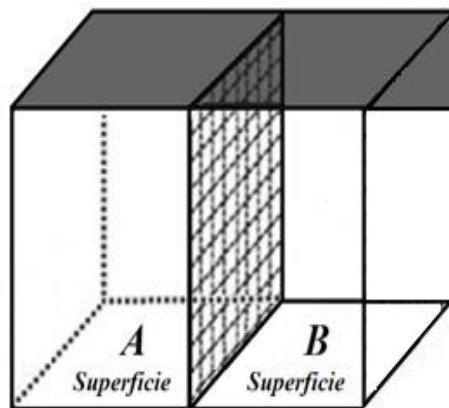


Figura 2. Ambiente novo de interação social com o coespecífico. Esquema do aparato

com a superfície A e B, utilizado para fazer interações sociais sensoriais e derrotas sociais.

### **3.3. PROTOCOLO**

As sessões experimentais foram feitas na fase clara do ciclo de luz claro/escuro, sob iluminação de uma lâmpada de 80w, a uma intensidade de 15 lux no assoalho do aparato. Antes do início da sessão, os animais experimentais foram levados para uma antessala, onde passavam por um período de 20 minutos de ambientação às condições experimentais.

#### **3.3.1. Experimento 1. Avaliação comportamental de camundongos antes (habituação) e após (Re-Exposição ao contexto) as interações não agressiva (situação controle) e agressiva (derrota social).**

*Fase de habituação (dias 1-3):* Os animais passaram pela fase de habituação (Hab) nos três primeiros dias, com um intervalo de 24 horas entre as exposições. Os sujeitos foram levados para sala experimental e posicionados na toca, onde ficavam confinados por 30 segundos, com o acesso ao túnel bloqueado por uma porta-guilhotina (anteparo de metal), para garantir que os animais se acalmassem logo após a manipulação do experimentador e a locomoção não fosse afetada. Na sequência, a porta-guilhotina era retirada e os sujeitos podiam explorar os diferentes compartimentos do aparato (toca, túnel e superfície A) durante 10 min. Para que os sujeitos fossem habituados a todas as condições do aparato presentes nas demais etapas, incluindo a maravalha como pista ambiental, em todos os dias, na superfície havia maravalha nova. Este procedimento foi repetido por três dias.

*Fase de interação (dias 4-7):* Para a fase de interação, os sujeitos foram separados aleatoriamente, tendo em conta o tempo de permanência na superfície A no terceiro dia de Hab. Sendo distribuídos em : (a) grupo controle GC (animais expostos à interação social com coespecíficos não agressores em presença de maravalha da sua caixa moradia) e (b) grupo derrotado GD (animais expostos à interação social com um coespecífico dominante, que exibe comportamento agressivo, exposto à maravalha da caixa moradia do agressor). Do quarto ao sétimo dia os animais-teste foram expostos a interações com o coespecífico, com intervalo de 24 horas entre as sessões. Todos os sujeitos foram individualmente colocados na toca por um período de 30s, quando, era retirada a porta-guilhotina, permitindo ao animal acesso ao túnel e à superfície A. Com auxílio de outra porta-guilhotina colocada na entrada do túnel, o experimentador, então, confinava o animal-teste na superfície A. Em seguida, introduzia-se na superfície B um coespecífico, agressor ou não, para o grupo derrotado e controle, respectivamente. Essa interação, sem contato físico direto, perdurava por 5 minutos. Após

esse período, o coespecífico (não agressor ou agressor) era introduzido na superfície A, onde interagia com o animal-teste por 3 minutos (tempo determinado pela latência de mordida do agressor multiplicada por 3) independentemente de apresentar feridas com sangrado, se o sujeito apresentava feridas profundas, o procedimento de eutanásia era realizado como foi feito por Polanco, L., & Vargas, C. (2011). Em seguida, o coespecífico era recolocado na superfície B por mais 5 minutos. Este procedimento era repetido por quatro dias consecutivos (dias 4-7). Os animais do GD foram expostos a um agressor diferente todos os dias, com a finalidade de não se habituar ao agressor sujeito, nem ao cheiro da maravalha.

*Reexposição (Dia 8):* Vinte e quatro horas após a quarta interação, todos os animais foram expostos livremente, uma única vez, ao aparato, sem a presença de um coespecífico, por um período de dez minutos com a maravalha da caixa-moradia do coespecífico utilizado na fase de interação. Assim, todos os sujeitos tinham a possibilidade de explorar os diferentes compartimentos do aparato (toca, túnel e superfície A) durante 10 minutos. O aparato foi limpo com álcool 20% e seco com um papel toalha entre cada animal exposto ao aparato.

### **3.3.2. Experimento 2. Avaliação comportamental de camundongos antes (Habituação) e após (Re-Exposição) interações não agressivas (controle) ou agressivas (derrota social) ocorridas em outro ambiente.**

*Fase de habituação (dias 1-3):* Na fase de habituação os animais foram expostos às mesmas condições experimentais descritas para o experimento 1, tendo três dias de habituação, com um intervalo de 24 horas entre exposições.

*Fase de interação (dias 4-7):* Para a fase de interação, os sujeitos foram separados aleatoriamente, tendo em conta o tempo de permanência na superfície A no terceiro dia de Hab. Assim, do quarto ao sétimo dia, os animais-teste foram expostos a interações com o coespecífico não agressivo (GC) ou agressivo (GD), em uma caixa nova (ver Figura 2), diferente daquela usada na habituação e re-exposição. O intervalo de tempo entre cada sessão de interação social foi de 24 horas.

Como pista ambiental para o Grupo Controle novo (GCn) (animais expostos à interação social com coespecíficos não agressores – ambiente novo), havia a maravalha da sua caixa moradia na superfície A, enquanto o grupo derrotado ambiente novo (GDn) (animais expostos à interação social com um coespecífico dominante, que exhibe comportamento agressivo- novo contexto). Todos os sujeitos foram individualmente colocados na superfície A. Em seguida,

introduzia-se na superfície B um coespecífico, agressor ou não, para os grupos derrotados e controle, respectivamente. Essa interação, sem contato físico direto, perdurava por 5 minutos. Após esse período, o coespecífico (não agressor ou agressor) era introduzido na superfície A, onde interagia com o animal-teste por 3 minutos (tempo determinado pela latência de mordida do agressor multiplicada por 3) independentemente de apresentar feridas com sangrado, se o sujeito apresentava feridas profundas, o procedimento de eutanásia era realizado como foi feito por Polanco, L., & Vargas, C. (2011) Em seguida, o coespecífico era recolocado na superfície B por mais 5 minutos. Este procedimento era repetido por quatro dias consecutivos (dias 4-7). Os animais do GDn foram expostos a um agressor diferente todos os dias, tal como descrito no experimento 1.

*Reexposição (Dia 8):* Vinte e quatro horas após a quarta interação, os animais foram expostos novamente ao teste de interação ao coespecífico, deixando que os animais explorassem livremente, uma única vez, tendo a possibilidade de explorar os diferentes compartimentos do aparato (toca, túnel e superfície A), por um período de 10 minutos, sem a presença do coespecífico, e com maravalha da caixa-moradia do ultimo coespecífico ao qual foi exposto. O aparato foi limpo com álcool 20% e seco com um papel toalha entre cada animal exposto ao aparato.

Todas as sessões foram gravadas por uma câmera montada de forma frontal ao aparelho. Os vídeos foram gravados em cartão de memória SD. De oliveira (2015), observou que ao analisar os 5 primeiros minutos e os 10 minutos de interação o perfil foi comportamental se mantia, dessa forma foram analisados os primeiros 5 minutos da terceira Hab, e a ReE. Os dados foram analisados por meio do software "X-plo-Rat 2005", desenvolvido pelo laboratório do Dr. Silvio Morato da Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da USP de Ribeirão Preto-Brasil (o software pode ser baixado livremente em <http://Scotty.FFCLRP.USP.br/X-plo-Rat.html>) (TEJADA.; TAVERNA; MORATO, 2017). Através deste software foi possível avaliar as medidas espaço-temporais e complementares. Medidas espaço-temporais: Frequência de entrada e tempo de permanência em segundos nos diferentes compartimentos (toca, túnel e superfície A). Medidas complementares: Frequência e duração de esticadas [do inglês – *stretched attend posture* (SAP), definido como comportamento de avaliação de risco no qual o animal projeta seu corpo para frente utilizando as patas dianteiras enquanto as patas posteriores permanecem na posição inicial do animal]; frequência e tempo, em segundos, de levantamento (do inglês, *rearing*) na superfície (definido como o comportamento no qual o animal eleva-se sobre as patas posteriores,



permanecendo na posição vertical); frequência e duração em segundos do comportamento de auto-limpeza (do inglês, *grooming*) nos três compartimentos [comportamento definido como cauteloso, que geralmente segue uma projeção céfalo-caudal (ex., EDMUNDS, 1974)]; tempo de ocultação defensiva na superfície A (comportamento no qual o animal escava e/ou empurra a maravalha na direção do agressor).

### **3.4. ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Nos casos em que os dados indicaram significância, estes foram transformados em log na base 10 ou raiz quadrada. Para os resultados que não passaram a prova de homogeneidade mesmo após serem transformados em log10 ou em raiz quadrada, realizou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida ou não pelo teste post hoc de Dunn.

Em seguida, os dados homogêneos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com exceção do tempo de grooming na toca, que foi analisado por meio do teste Kruskal-Wallis. Os dados da análise espaço-temporal foram submetidos a ANOVA tri-fatorial: [(Fator 1:Local (toca, túnel, superfície); Fator 2: Estímulo (agressor, não agressor); Fator 3 de medidas repetidas: Exposições (habituação, reexposição), os dados de levantamento e grooming foram analisados por ANOVA bi-fatorial, [Fator 1: Estímulo (agressor – não agressor), Fator 2 com medidas repetidas: Exposições (Habituação - Reexposição)]. Às ANOVAS com valores de F e p significativos, seguiram-se pelo teste post-hoc de comparações múltiplas de Duncan. Valores de p iguais ou inferiores a 5% (0,05) foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Experimento 1. Resposta comportamental de camundongos antes (habituação) e após (Re-Exposição ao contexto) as interações não agressiva (situação controle) e agressiva (derrota social).

A Figura 3 mostra as medidas espaço-temporais dos animais expostos a quatro interações agressivas (derrotados) ou não agressivas (controle) na caixa de interação social, e reexpostos ao aparato de teste de interação sem a presença de um coespecífico. Em relação ao tempo de permanência (painel A), a ANOVA apontou significância para o fator local [ $F_{2,237} = 257.80$ ,  $P = 0.05$ ], mas não apontou significância para os fatores estímulo e exposição. No entanto, a análise revelou interação entre os três fatores [ $F_{2,237} = 16.78$ ,  $P = 0.05$ ]. A análise post hoc de Duncan indicou diminuição no tempo de permanência na superfície, para o GD, na fase de ReE em comparação com a Hab [ $P = 0.008$ ] e na fase de ReE em comparação ao GC [ $P = 0.0001$ ]. De modo contrário, no compartimento “toca”, a análise post hoc revelou um aumento no tempo de permanência dos sujeitos do GD em comparação com sua fase de Hab [ $P = 0,0002$ ] e com os animais do GC [ $P = 0,0001$ ]. Em relação a frequência de entradas (painel B), a estatística demonstrou uma diferença significativa apenas para o fator local e fator exposição [ $F_{2,237} = 49.78$  e  $F_{1,237} = 74.35$ ,  $P = 0.05$ , respectivamente] bem como uma interação entre ambos os fatores [ $F_{2,237} = 4,50$ ,  $P = 0.05$ ]. A análise post hoc de Duncan apontou que os animais apresentam maior número de entradas no túnel em comparação com a toca [ $P = 0.0001$ ] e a superfície [ $P = 0.0001$ ]. O post hoc para interação entre local versus exposição, apontou uma diferença no túnel entre a Hab e a ReE [ $P = 0.0001$ ].

Figura 3- Tempo e frequência de entradas

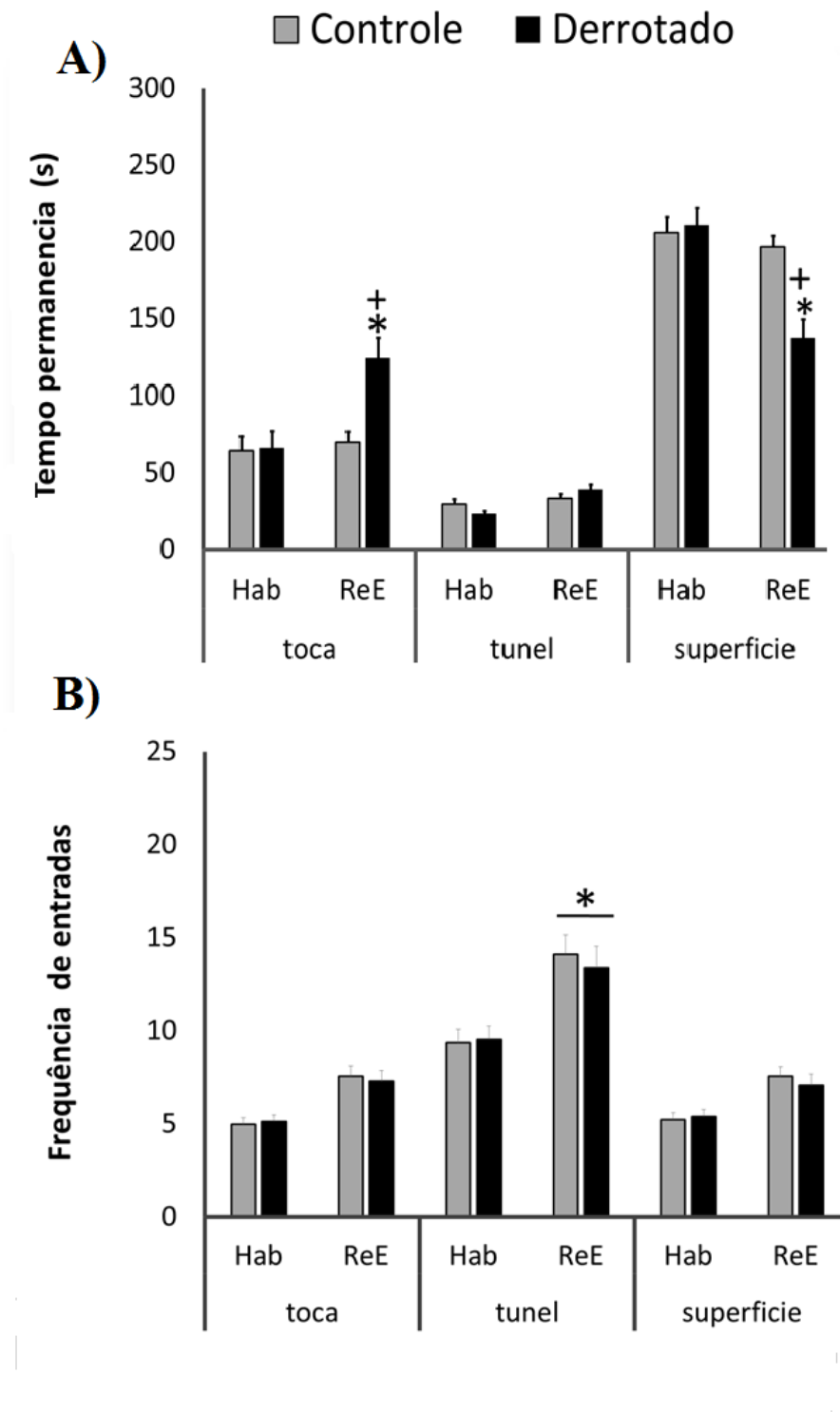


Figura 3. Efeitos da exposição ao coespecífico agressor (N=39) ou não agressor (N=42) sobre o tempo de permanência (em segundos) (painel A) e frequência de entradas (painel B) e nos diferentes compartimentos do aparato durante as fases de Hab ou ReE. Barras: média  $\pm$  EPM; \*p < 0,05 em comparação à fase de Hab do GD; + p < 0,05 em comparação ao GC; #p < 0.05 comparação entre os compartimentos.

A Figura 4 mostra a frequência e o tempo de auto-limpeza (grooming) exibidos pelos

animais na toca e na superfície A durante o período de Hab e na ReE ao aparato. Para a frequência de grooming na toca (painel A), a ANOVA bifatorial demonstrou efeitos significativos para os fatores estímulo e exposição [ $F_{1,79} = 4,08$ ,  $P = 0.05$  e  $F_{1,79} = 6,34$ ,  $P = 0.05$ , respectivamente]. De maneira similar, o teste apontou significância no fator exposição para frequência de grooming na superfície (painel B) [ $F_{1,79} = 19,40$ ,  $P = 0.05$ ]. Tanto para frequência de grooming na toca, quanto para frequência de grooming na superfície, houve interação dos fatores exposição e estímulo [Toca:  $F(1,79) = 11,34$ ;  $p < 0.05$ ] e superfície [ $F_{1,79} = 6,00$ ,  $P = 0.05$ ]. Kruskal-Wallis revelou diferença significativa [ $H = 20.5$ ,  $P = 0.05$ ]. Em relação ao tempo de grooming na superfície (painel D) a ANOVA bifatorial revelou significância no fator exposição [ $F_{1,79} = 20,12$ ,  $P = 0.05$ ] e uma interação entre fatores [ $F_{1,79} = 5,51$ ,  $P = 0.05$ ].

**Figura 4. Frequência e tempo de grooming.**

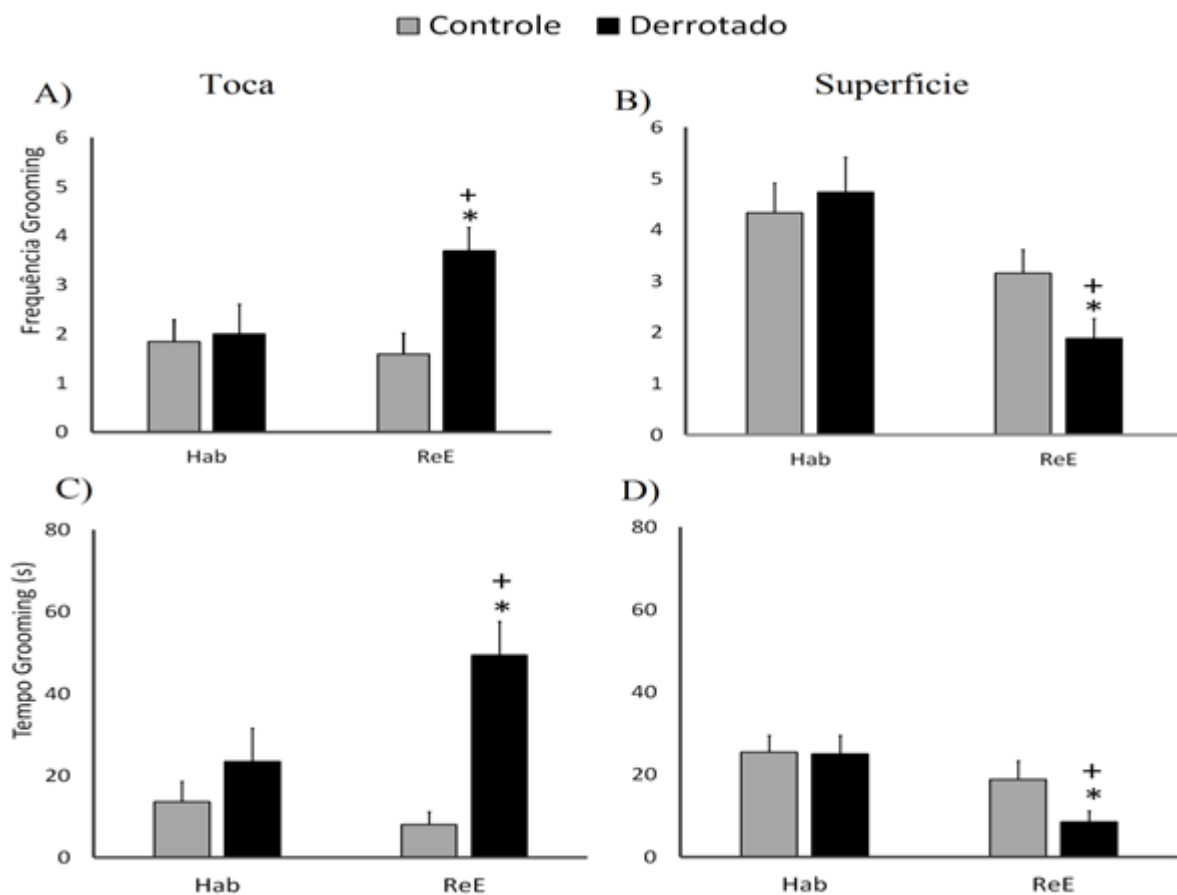


Figura 4. A representação gráfica do comportamento de grooming exibido por animais expostos ao coespecífico agressor ou não agressor na fase de Hab e ReE. Os painéis A e B mostram frequência de grooming na toca e na superfície, respectivamente. Os painéis C e D ilustram o tempo de grooming exibidos na toca e superfície, respectivamente. Barras: média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$  em comparação à fase de Hab do GD; + $p < 0,05$  comparação com a ReE do GC.

A Figura 5 mostra a soma das frequências de SAP (painel A) dos três compartimentos, tendo como resultado o SAP total, ao qual foi aplicado o teste Kruskal-Wallis que apontou diferença significativa [H=7,8, P = 0,05]. O teste post-hoc de Dunn revelou uma diferença significativa intragrupo e entre grupos, apontando aumento de frequência de SAP total do grupo derrotado na fase de reexposição em comparação com a Hab [P=0,006] e com o grupo controle na ReE [P=0,006]. Em relação aos efeitos da derrota social sobre o tempo de escavar (painel B), os dados não obedeceram a uma distribuição normal e foi utilizada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis [H=7,8, P= 0,05], seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. A análise revelou diferença significativa [P=0,007] e o teste post hoc confirmou uma diminuição do tempo de escavação do grupo de animais derrotados em comparação a seu próprio tempo gasto durante a Hab, bem como em relação ao tempo do grupo controle na fase de ReE [P=0,05].

**Figura 5. Frequência de SAP total e tempo de escavar.**

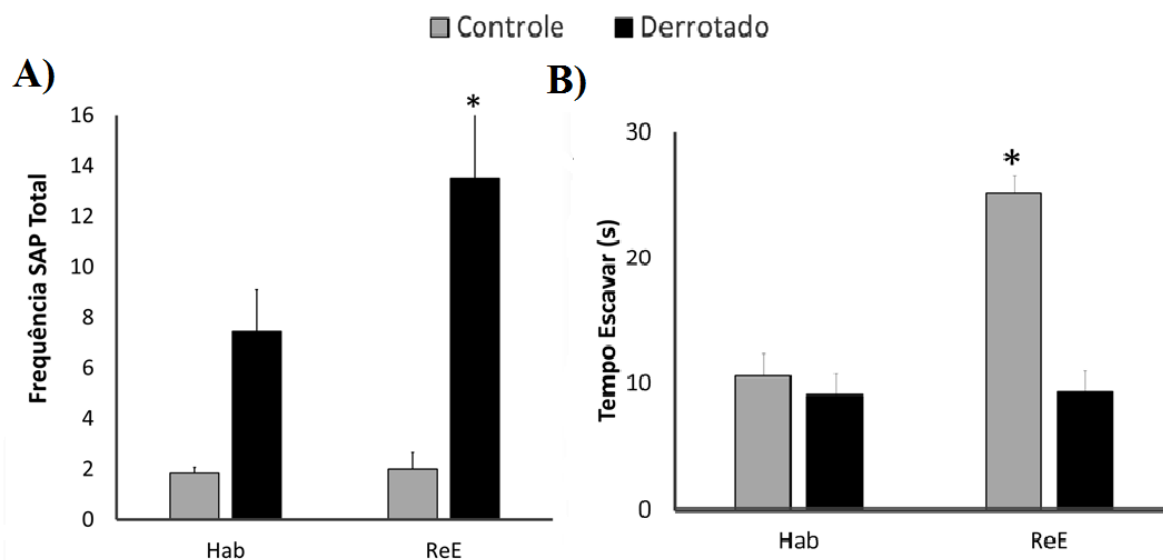


Figura. 5. Frequência de SAP total (painel A), tempo de escavar na superfície A (painel B) nos grupos expostos a coespecíficos agressor ou não agressor. Barras: média ± EPM; \*p < 0,05 em comparação à fase de Hab do GD; +p < 0,05 comparação com a ReE do GC.

O tempo e frequência de levantamentos podem ser observados na Figura 6. Foi utilizada a ANOVA bifatorial com medidas repetidas a qual apontou significância apenas para o fator estímulo [ $F_{1,79} = 6.09$ ,  $P = 0.05$ ] nos parâmetros frequência de entradas (painel A) e tempo de permanência (painel B). A mesma análise não apresentou interação entre fatores [ $P = 0.3$ ]. O teste post hoc de Duncan revelou diferença significativa tanto na frequência de entrada na fase de ReE dos GD em comparação com o GC [ $P = 0.02$ ], como no tempo de permanência [ $P = 0.006$ ].

**Figura 6. Frequência e tempo de levantamentos**

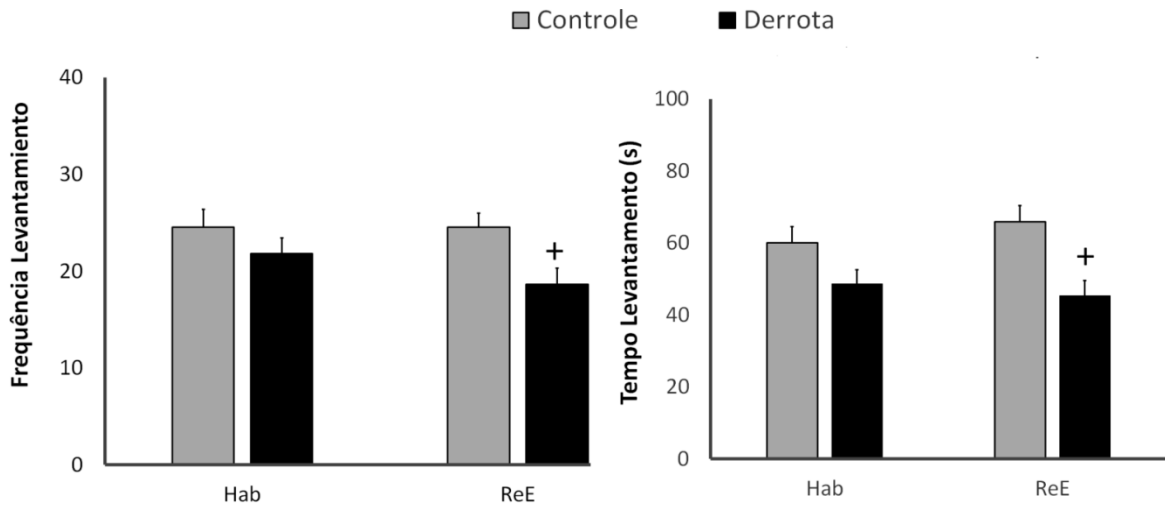


Figura 6. Frequência de levantamentos (Painel A) e tempo de levantamento em segundos (Painel B) na superfície A exibidos pelos grupos controle e derrotado. Barras: média  $\pm$  EPM; +  $p < 0,05$  comparação com a ReE do GC.

#### **4.2. Experimento 2. Respostas comportamentais de camundongos antes (Habituação) e após (Re-Exposição) interações não agressivas (controle) ou agressivas (derrota social) ocorridas em outro ambiente.**

A Figura 7 ilustra as medidas espaço-temporais dos animais submetidos a quatro interações agressivas (derrotados) ou não agressivas (controle) em ambiente diferente daquele usado na Habituação e Reexposição, registradas no momento da reexposição ao aparato Teste de interação, porém sem a presença de um coespecífico. Em relação ao tempo de permanência (painel A), a ANOVA apontou significância para o fator local [ $F_{2,45} = 664$ ,  $P = 0,0001$ ], mas não apontou significância para os fatores estímulo e exposição. No entanto, a análise revelou interação entre local e exposição [ $F_{2,45} = 664$ ,  $P = 0,05$ ]. A análise post hoc de Duncan indicou que o GCn e GDn permanecem na maior parte de tempo na superfície na fase de Hab em comparação ao local toca [ $P = 0.0001$ ] e túnel [ $P = 0.0001$ ], e na fase de ReE os grupos permanecem a maior parte de tempo na superfície em comparação à toca [ $P = 0.0001$ ] e ao túnel [ $P = 0.0001$ ]. Em relação a frequência de entradas (painel B), a estatística demonstrou uma diferença significativa apenas para o fator local [ $F_{2,45} = 16.28$ ,  $P = 0.0001$ ]. A análise post hoc de Duncan apontou que os animais apresentam maior número de entradas no túnel em comparação com a toca [ $P = 0.0001$ ] e a superfície [ $P = 0.0001$ ].

Figura 7. Tempo e frequência de entradas nos compartimentos

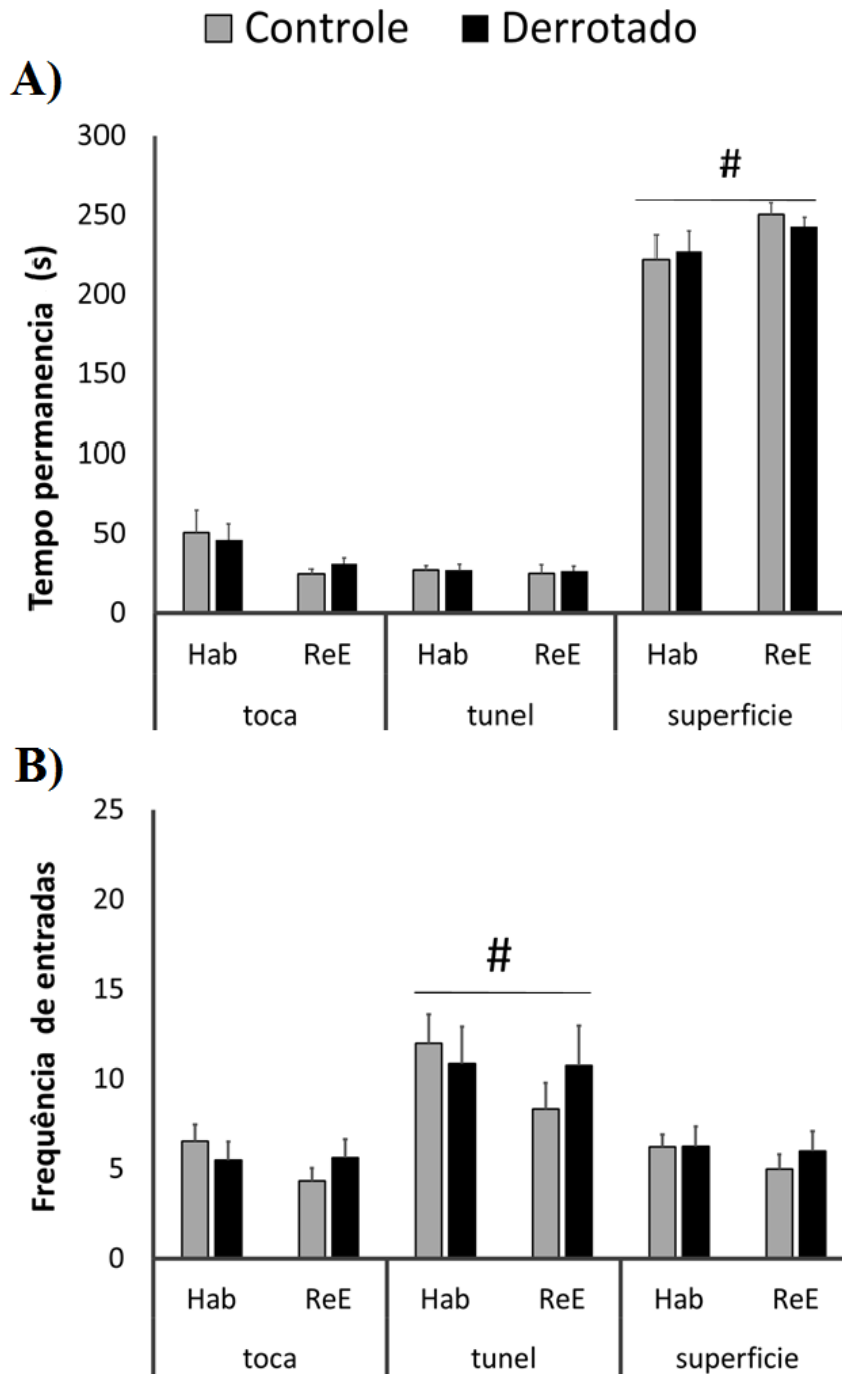


Figura 7. Efeitos da submissão ao coespecífico agressor (N=8) ou não agressor (N=9) em ambiente diferente ao da Habituação e Reexposição sobre o tempo de permanência (em segundos) (painel A) e frequência de entradas (painel B) e nos diferentes compartimentos do aparato durante as fases de Hab ou ReE. Barras: média  $\pm$  EPM; #p < 0.05 comparação com toca e superfície.



A Figura 8 mostra a frequência e o tempo de auto-limpeza (grooming) exibidos pelos animais do GCn e GDn na toca e na superfície A durante o período de Hab e na ReE ao aparato. Para a frequência (painel A) e tempo (painel C) de grooming na toca, a Kruskal-Wallis, não revelou diferença significativa nos [H=7,81, P=0,25 e H=2,34, P=0,23]. De maneira similar, ANOVA bifatorial não demonstrou efeitos significativos para os fatores.

**Figura 8. Frequência e tempo de grooming**

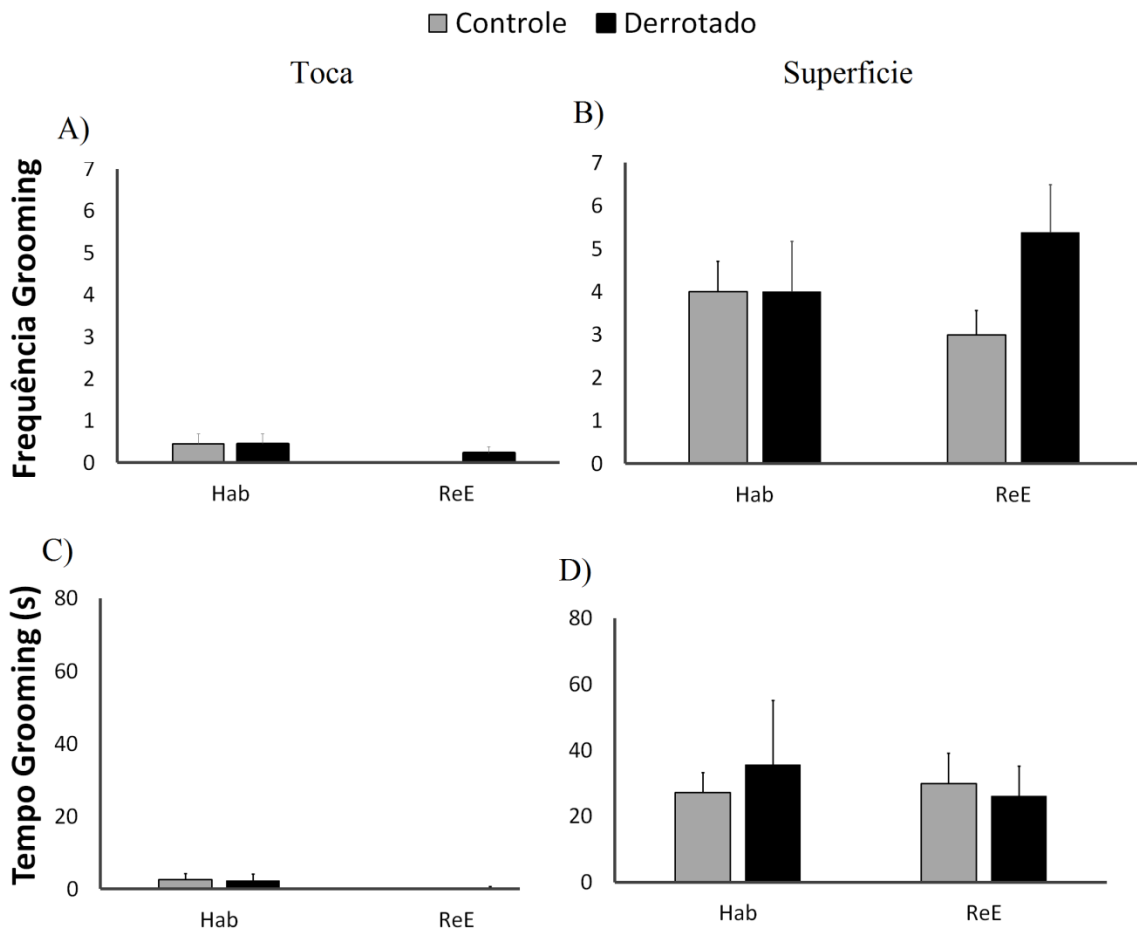


Figura 8. A representação gráfica do comportamento de grooming exibido por animais expostos ao coespecífico agressor ou não agressor na fase de Hab e ReE. Os painéis A e B mostram frequência de grooming na toca e na superfície, respectivamente. Os painéis C e D ilustram o tempo de grooming exibidos na toca e superfície, respectivamente.

A Figura 9 mostra a soma das frequências de SAP (painel A) dos três compartimentos,

tendo como resultado o SAP total, ao qual foi aplicado o ANOVA de duas vias com medidas repetidas, o qual não apontou diferenças no intergrupo ou entre grupos. Em relação aos efeitos da derrota social sobre o tempo de escavar (painel B), a ANOVA mostrou uma diferença no fator exposição [ $F_{1,15} = 4.40$ ,  $P = 0,05$ ]. A análise post hoc de Duncan indicou que o GCn aumenta o tempo de escavar na fase de ReE com comparação da fase de habituação [ $P = 0.01$ ] e em comparação com o grupo GDn na fase de ReE [ $P = 0.05$ ].

**Figura 9. Frequência de SAP total e tempo de escavar.**

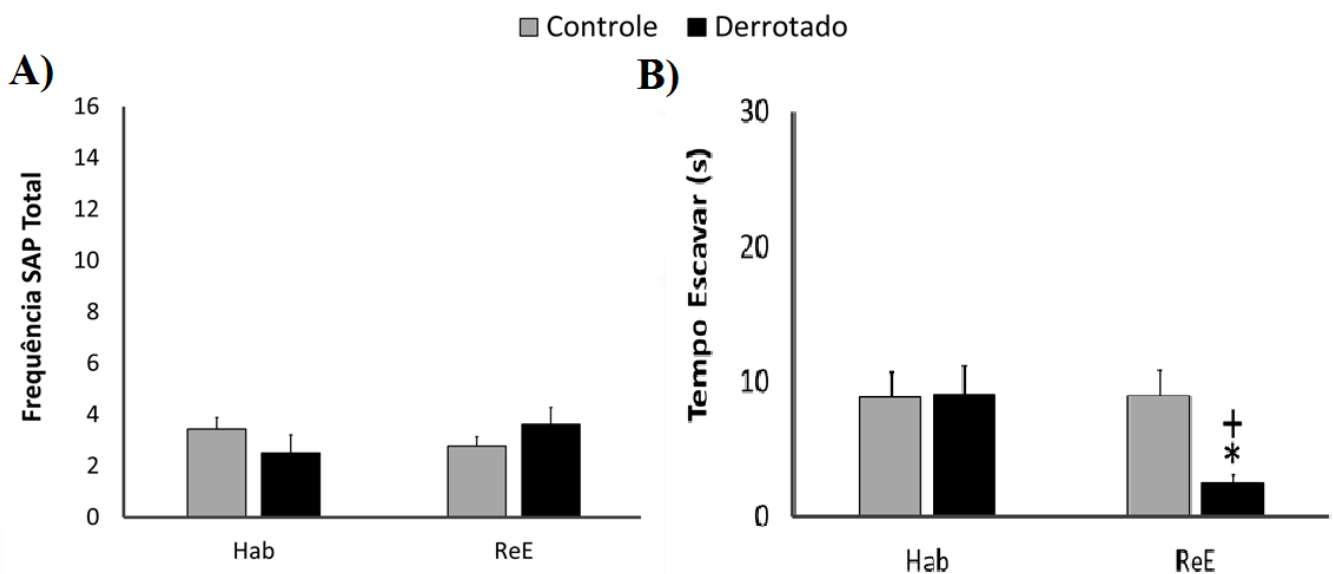


Figura 9. Frequência de SAP total (painel A), tempo de escavar na superfície A (painel B) nos grupos expostos a coespecíficos agressor ou não agressor. Barras: média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$  em comparação à fase de ReE do GDn

Figura 10 mostra a frequência (painel A) e o tempo (painel B) de levantamentos

exibidos pelos animais submetidos a quatro interações agressivas (derrotados) ou não agressivas (controle) em ambiente diferente daquele usado na Habituação e Reexposição, registrados no momento da reexposição ao aparato Teste de interação, porém sem a presença de um coespecífico. Foi utilizada a ANOVA bifatorial com medidas repetidas a qual apontou significância apenas para o fator exposição para as duas medidas [ $F_{1,15} = 5.79$ ,  $P = 0.05$  e  $F_{1,15} = 5$ ,  $P = 0.05$ , respectivamente] mostrando que o GCn e GDn exibe maior frequência e tempo de levantamento na fase de ReE em comparação com Hab.

**Figura 10. Frequência de levantamentos**

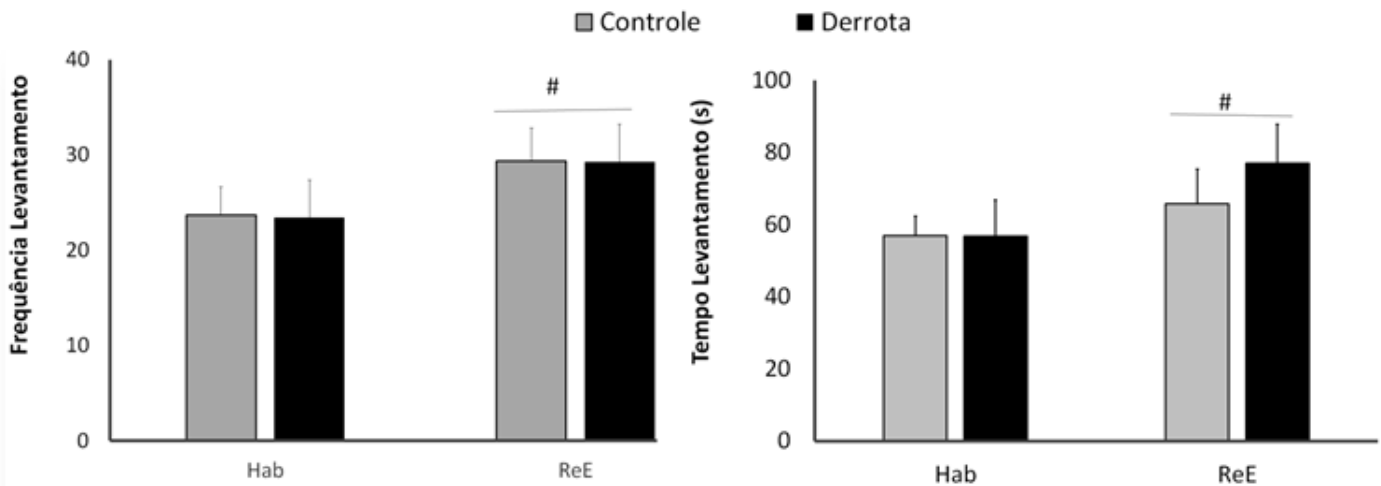


Figura 10. Frequência de levantamentos (Painel A) e tempo de levantamento em segundos (Painel B) na superfície A exibidos pelos grupos controle e derrotado. Barras: média  $\pm$  EPM; #  $p < 0,05$  comparação com a Hab.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo padronizar um teste experimental capaz de gerar comportamentos defensivos relacionados à aversão contextual por meio da interação agressiva (derrota social e interação com estímulos sensoriais associados ao agressor). Para tanto, dois experimentos foram conduzidos, levando-se em consideração se a derrota social (a) leva os camundongos a evitarem o contexto associado ao confronto agressivo (Experimento 1) ou (b) leva os camundongos a evitarem a explorar ambiente neutro e familiar (Experimento 2).

Assim, no Experimento 1, destaca-se o resultado relevante do tempo de permanência nos compartimentos (Figura 3A), em que animais expostos a pistas ambientais olfativas presentes nos dias das derrotas sociais apresentaram uma diminuição do tempo de permanência na superfície na fase de ReE, isto é, no local onde foram feitas as interações. Esta evitação pelo lugar onde tem sinais do animal agressor também foi examinada por Berton et al (2006), os quais observaram em animais expostos a interações agressivas por dez dias, sendo cada dia exposto por 10 minutos de agressão física e 24 horas de agressão sensorial, que ao serem expostos ao modelo de interação social 24 horas após as derrotas e depois de quatro semanas, têm respostas de evitação mais robustas em comparação aos animais que foram expostos a um objeto não animado. Nossos resultados e outras pesquisas (MACEDO, et al., 2018) corroboram que existe um deterioro na procura pela interação social após da derrota social. Este perfil comportamental observado em nossos animais foi acompanhado por uma preferência pela região da toca (aumento do tempo de permanência na toca), mostrando assim, um efeito espelho entre a preferência pela toca e a evitação da superfície A. Somado a isso, a diminuição na frequência e no tempo de levantamento na superfície (Figura 6) parecem corroborar a redução da exploração do ambiente com contexto aversivo. Nossos resultados contrastam aos observados por De Oliveira et al., (2015), em que os animais não apresentam evitação ao contexto 24 horas após o embate com o agressor, mesmo quando ao contexto é adicionada à maravalha do agressor. Os resultados de De Oliveira et al., (2015) contrastam com os apresentados no Experimento 2, (sujeitos ReE ao contexto na qual são Hab e expostos a interações sociais num contexto novo), onde os animais de ambos grupos permanecem mais tempo na superfície, independente da fase ou o estímulo ao que foi exposto (Figura 7A). Assim, isso mostra que os animais que são reexpostos (ReE) ao contexto onde foram agredidos parecem apresentar evitação do contexto em comparação com animais que são agredidos num contexto novo, revelando que não é suficiente ter interações agressivas com maravalha do agressor, é preciso ter estresse psicológico e ser no mesmo contexto no qual foi

derrotado para gerar aversão contextual. Finalmente, este resultado está acompanhado do aumento de levantamentos na superfície, na fase de ReE no GCn e GDn (Figura 10) em comparação com Hab do experimento dois, o que reafirma que o aumento de levantamentos está relacionado com o tempo que gastam os animais na superfície. Nossos resultados indicam que é possível que o protocolo experimental proposto no presente estudo seja capaz de gerar respostas comportamentais defensivas mais robustas, como as medidas espaço-temporais.

Além deste resultado, é interessante ressaltar que animais expostos a coespecíficos não agressores (Experimento 1), não apresentam quaisquer sinais de evitação ao ambiente pareado com a interação. Em outras palavras, não houve alteração no tempo de permanência ao contexto onde foram feitas as interações, quando comparados ao perfil comportamental apresentado no terceiro dia de Hab. Esses resultados sugerem que a diminuição do tempo gasto na superfície, observada durante a ReE ao aparato em ambos experimentos, exibido pelos animais submetidos à derrota social, é dependente da interação com o coespecífico dominante, e não decorrente de uma diminuição da atividade geral (ex., locomoção). Resultados semelhantes foram previamente relatados por Faturi et al. (2014), em que ratos expostos ao aparato contendo somente a maravalha do agressor apresentaram aversão ao local da agressão.

Também se pode observar que os animais expostos às interações não agressiva ou agressiva na ReE ao contexto das interações ou contexto novo, apresentaram maior frequência de entradas na fase de ReE (Figura 3B; Figura 7B), sendo a frequência de entradas no túnel maior em comparação com a toca e a superfície. Esta resposta pode estar relacionada com o fato de o túnel ser um local de passagem entre os outros compartimentos (toca e superfície), como previamente sugerido por outros autores (CRESTANI, 2017; YANG et. al, 2004). Portanto, a aversão à superfície, caracterizada pelo aumento e diminuição do tempo gasto na toca e superfície, respectivamente, observada no GD, não decorre da diminuição de exploração, pois os sujeitos dos diferentes grupos tiveram aumento de locomoção na ReE.

Já, em relação ao comportamento de grooming, houve um aumento na sua frequência e tempo na toca, apresentado pelos sujeitos derrotados (Experimento 1), em comparação com o GC, na fase de ReE ao aparato. Este fenômeno não foi observado nos GDn e GCn do Experimento 2. De modo interessante, o comportamento de autolimpeza do GD foi menos expresso na superfície A, durante a ReE ao contexto. O comportamento de grooming parece ser modulado pelo estresse e ansiedade, sendo visto como um comportamento adaptativo e de

preparação para o estresse (KALUEFF e TUOHIMA, 2005). Em protocolos crônicos de interação agressiva em ratos (KALUEFF et al., 2016a; LUMLEY, 2000) e camundongos (DENMAK, et, al., 2010), foi mostrada uma elevada resposta de grooming e uma mudança no padrão de movimentos. Adicionalmente, Crestani e colaboradores (2017) sugeriram que o aumento da expressão de grooming está relacionado com a redução de excitação após uma interação agressiva, o que poderia indicar como atividade dirigida a aliviar a ansiedade após um confronto agressivo (KALUEFF et al., 2016a). Em contraparte, um estudo feito em camundongos demonstrou uma ativação do sistema suprarrenal (catecolaminas) e posteriormente uma ativação adrenocortical, em ambos os sexos, isso, com a finalidade de subministrar a energia suficiente para reagir frente aos estímulos aversivos (QIAO, 2018; DEBEN e BRAIN, 1982; ZHUKOVSKAYA; YANAGAWA.; FORSCHLER, 2013 SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992).

Ainda, o aumento de grooming na toca se dá acompanhado por aumento na frequência de SAP total na fase de ReE (Experimento 1), aparentemente indicando que a exposição ao coespecífico agressor, mas não ao coespecífico não agressor, produz comportamento recuperativo em um lugar seguro e aumento de avaliação de risco no aparato como um todo, devido à potencial presença do agressor no contexto. É importante lembrar que os animais expostos à interação agressiva (Experimento 1) tinham uma predisposição espontânea para realizar SAP quando comparados ao GC na Hab (Figura 5). Neste ponto é importante lembrar que os camundongos são animais sociais, que vivem em grupos grandes e com organização social hierárquica, fazendo com que no ambiente natural sempre estejam expostos a um coespecífico dominante, o que promove o aumento do SAP nos sujeitos derrotados e mesmo assim ainda entrem na superfície onde foram derrotados, ou seja, os animais aumentam a frequência de SAP, mas ainda exploram o compartimento associado à derrota, resultado similares foram achados por Carneiro de oliveira e colaboradores 2017 em camundongos expostos ao RET, onde os animais estressados têm demonstrado uma diminuição de avaliação de risco na área protegida (toca e tunnel) e um aumento nas áreas desprotegidas, mostram uma similitude com os nossos resultados, sendo que os animais mesmo assim estejam próximas de senhas de possível perigo, exibem comportamentos de avaliação de risco.

Nos resultados do Experimento 2, os animais que são expostos a coespecífico não agressor ou agressor não aumentam o tempo de SAP, o que reforça a hipótese de que não é suficiente ter agressões físicas e sensoriais em presença de maravalha do agressor para ter uma aversão contextual, também é necessário que as agressões sejam no mesmo contexto do

ReE para que os sujeitos associem os sinais contextuais com as interações agressivas e, deste modo, a aversão contextual. Outro resultado importante é referente ao GC, o qual não apresentou diminuição de frequência de SAP na ReE. Esses resultados podem ser comparados com os obtidos por Crestani e colaboradores (2017), os quais observaram uma diminuição de frequência de SAP na ReE no GC, propondo assim, uma valência positiva da interação não agressiva quando os animais são expostos ao contexto da interação social. Ainda em relação aos resultados obtidos com os animais do GC, pode-se sugerir que o protocolo proposto no presente estudo reduz a variabilidade na exibição das respostas comportamentais registradas na Hab e na ReE ao aparato, aumentando o rigor do teste.

Quanto ao tempo de escavar na superfície, nossos resultados indicaram que animais expostos ao agressor passam o mesmo tempo escavando na habituação e no retest na maravalha com sinais olfativos do oponente na superfície A (Figura 5). O aumento de escavação no grupo controle é associado com a procura por interação social não agressiva, na maravalha da sua própria caixa moradia. Estes resultados são sugestivos de que a diminuição do tempo de escavar a maravalha com sinais olfativos do agressor seja uma estratégia de evitação defensiva, lembrando que a superfície A é o único compartimento do aparato com maravalha, ele aumenta o tempo de permanência no local que oferece uma maior segurança.

Este resultado são corroborado por aqueles observados na evitação, descritos no Experimento 2 (Figura 9), onde os animais que são agredidos DIMINUEM o tempo de escavar, em comparação com os animais do grupo não agredido e exposto na fase de interações num contexto novo. Em conjunto, como foi indicado em pesquisas anteriores, este comportamento poderia ser visto como uma estratégia de avaliação de risco quando é associado à ausência de sinais visual sob uma fonte ambígua de ameaça (PINEL et al., 1994; CAMPOS et al., 2013) em comparação que quanto se tem uma sinais olfativa e visual. Por outro lado, tais resultados também são sugestivos de que os animais expressar comportamento de exploração, na procura de interação social num contexto de segurança no GC, assim, os resultados reforçariam a nossa hipótese de que as agressões necessitam ser no contexto para gerar uma associação de diferentes estímulos sensoriais.

O conjunto de alterações nos comportamentos dos animais expostos ao contexto na presença de pistas olfativa e as derrotas feitas no mesmo contexto apresentados nesse estudo, mostra a relevância etológica dessas pistas quando associadas com um estímulo potencialmente ameaçador, indicando que as sinais olfativas poderiam indicar um potencial

perigo, facilitando a evitação social dos animais previamente derrotados (MACEDO, et al., 2018)) Em resumo, estudos anteriores demonstraram que uma única interação agressiva não é suficiente para gerar um condicionamento contextual robusto, sendo necessárias diferentes pistas ambientais que em conjunto consigam modificar diversas medidas complementais e espaço-temporais (CRESTANI et. al., 2017; DE OLIVEIRA, 2015; KRYPOTOS, 2015).

Já, Covington III e colaboradores (2005) mostraram que exposição sucessiva a derrota social pode levar ao aumento dos neurotransmissores dopamina e glutamato no CPFm, tornando esse substrato vulnerável ao estresse. Em contrapartida, no presente estudo demonstrou-se que um protocolo com mais interações agressivas (quatro interações, com intervalo de 24 horas, compostas de interação sensorial e interação física) e pistas olfativas é capaz de produzir esse condicionamento, demonstrando interessantemente que interações repetidas, mas não precisamente de forma crônica, a estímulos aversivos pode gerar aversão contextual.

Foram propostos em estudos anteriores (FAVORETTO et al. 2016; CRESTANI, 2017; LARRIEU, T.; SANDI, C. 2018; FRANKLIN et al., 2017) protocolos com arranjos experimentais distintos visando obter um condicionamento ao contexto baseado em interações agressivas. Contudo, em razão das várias inconsistências nas respostas do animal agredido, a literatura ainda não apresentou o uso de um teste robusto para se avaliar o medo/aversão ao contexto. É importante ressaltar que no presente estudo, obteve-se esse condicionamento com uma interação sensorial de 5 minutos antes da interação física propriamente dita, a qual foi de um tempo de 3 minutos sem importar se era feita a postura de submissão, já que uma interação física intensa faz com que o animal intruso consiga reconhecer o sujeito agressor e assegura a exibição de sua postura de submissão, a qual é fundamental para a caracterização da derrota social, este tempo também é menor em comparação com estudos feitos, por exemplo, com rotocolos de presa-predador (FEDOROFF; TAYLOR.,200;. CARNEIRO DE OLIVEIRA al et, 2017), residente intruso (COOPER al et, 2017; LUMLEY, 2000)e preferência por um lugar condicionado (HYMEL al et 2014; RIAD-ALLEN; VAN DER KOOY, 2013), mostrando-se suficiente para gerar uma aversão condicionada; a qual foi seguida de nova exposição à interação sensorial por 5 minutos. Igualmente, foi demonstrado que só 5 minutos de exposição posterior à derrota seriam suficientes para promover déficits de interação social, ou seja, diminuição de motivação na interação social de longo prazo, em um protocolo de interações agressivas crônicas (ex., 10 derrotas; Favoretto et al., 2016). Nossos resultados, no entanto, indicam que apenas quatro interações agressivas são suficientes para a ocorrência da aversão condicionada ao contexto



do embate.

Finalmente, para próximas pesquisas, seria interessante observar se estas respostas de aversão contextual são exibidas após vários dias da exposição agressiva, como foi observado por Favoretto et al. (2016), os quais descreveram ser a derrota social crônica eficaz a induzir evitação social por um período de até quatro semanas, igualmente seria de grão interesse usar maravalha limpa no local da toca, já que tem sido demonstrado em vários estudos prévios( referencia) que o ocultamento defensivo (comportamento dos roedores ao empurrar, orvalhar ou mover materiais em direção da ameaça (PINEL al et, 1994)) é importante para o analise de comportamento defensivo.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstram que quatro interações sociais agressivas, de forma sensorial e física, na presença de pistas ambientais, são suficientes para gerar aversão condicionada ao contexto em camundongos. Essa aversão contextual é caracterizada pela evitação do local em que ocorreram as interações agressivas e pela preferência pelo local que oferece mais segurança. Ainda, essas alterações em medidas clássicas utilizadas em modelos de aversão ao contexto são acompanhadas de alterações no grooming, no SAP, nos levantamentos e no comportamento de escavar.

## REFERÊNCIAS

- ALBARRACIN, G.; ROVIRA, J.; CARRERAS, L.; REJAS, J. Economic and epidemiological aspects of generalized anxiety disorder: a review of the literature, **Actas Españolas de Psiquiatría**, [s.l.], v. 36, n. 3, p. 165–176, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478457>.
- ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 187–193, 1994.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorder V. Washington D C: APA, 2013. v. 209p. 971
- ARMARIO, A.; ESCORIHUELA, R. M.; NADAL, R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1121–1135, 2008.
- BARLOW, D. H. . Anxiety and its disorders: The nature and treatment of anxiety and panic (2nd ed.). **Guilford Press**. New York, NY, US, 2002.
- BERTON, O.; SELF, D. W.; BERTON, O.; MCCLUNG, C. A.; DILEONE, R. J.; KRISHNAN, V.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; GRAHAM, D.; TSANKOVA, N. M.; BOLANOS, C. A.; RIOS, M.; MONTEGGIA, L. M.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, [s. l.], v. 311, p. 864–868, 2006. Disponível em: <papers3://publication/uuid/D6D157D1-CA28-4B3E-AB3E-1ECEF0120530>
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3–14, jan. 1989.
- BLANCHARD, D., BLANCHARD, R & RODGERS, R. Risk Assessment and Animal Models of Anxiety. **Animal Models in Psychopharmacology**. 1991b. p 117-134. Disponível em: Tomado de [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-6419-0\\_13](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-6419-0_13).
- BLANCHARD, R. J. et al. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 15565, 1993c.
- BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 93–

100, 2010. Disponível em: <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs/article/viewFile/8207/5320>

BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional. Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento (2001). p. 146 . São Paulo.

CAMPOS, K. F. C.; AMARAL, V. C. S.; RICO, J. L.; MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey-predator interaction test. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 240, n. 1, p. 160–170, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.023>

CARNEIRO DE OLIVEIRA, P. E.; ZANIBONI, C. R.; CARMONA, I. M.; FONSECA, A. R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 657, p. 204–210, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.008>

CARLSON, J. N.; FITZGERALD, L. W.; KELLER, R. W.; GLICK, S. D. Lateralized changes in prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 630, n. 1–2, p. 178–187, 1993.

COOPER, M. A.; SEDDIGHI, S.; BARNES, A. K.; GRIZZELL, J. A.; DULKA, B. N.; CLINARD, C. T. Dominance status alters restraint-induced neural activity in brain regions controlling stress vulnerability. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 179, n. March, p. 153–161, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.06.003>

COVINGTON III, H.E.; KIKUSUI, T.; GOODHUE, J.; NIKULINA, E.M.; HAMMER, R.P.; MICZEK, K.A. Brief Social Defeat Stress: Long Lasting Effects on Cocaine Taking During a Binge and Zif268 mRNA Expression in the Amygdala and Prefrontal Cortex, **Neuropsychopharmacology**. V .30 P.310-321. 2005.

CRESTANI, A. M.; CIPRIANO, A. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Single aggressive and non-aggressive social interactions elicit distinct behavioral patterns to the context in mice. **Behavioural Processes**, [s. l.], n. November 2017, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.04.010>>

CRESTANI, A. M. Aversão ao contexto associado ao estresse de derrota social em camundongos: Um estudo etológico. 2015. **Universidade Estadual Paulista**, [s. l.], 2015.

CROWCROFT, P.; ROWE, F. P. Social organization and territorial behavior in the. *Proceedings of the Zoological Society of London*, v. 140, n. 3, p. 517–531, 1963.

CURRAN, K. P.; CHALASANI, S. H. Serotonin circuits and anxiety: What can invertebrates teach us. **Invertebrate Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 81–92, 2012.

DARWIN, C. R. **The expression of the emotions in man and animals**. London: John Murray, 1872. v. 55

DE BOER, S. F. Animal models of excessive aggression: implications for human aggression and violence. **Current Opinion in Psychology**, [s. l.], v. 19, p. 81–87, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.006>

DENMARK, A.; TIEN, D.; WONG, K.; CHUNG, A.; CACHAT, J.; GOODSPEED, J.; GRIMES, C.; ELEGANTE, M.; SUCIU, C.; ELKHAYAT, S.; BARTELS, B.; JACKSON, A.; ROSENBERG, M.; CHUNG, K. M.; BADANI, H.; KADRI, F.; ROY, S.; TAN, J.; GAIKWAD, S.; STEWART, A.; ZAPOLSKY, I.; GILDER, T.; KALUEFF, A. **V. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning**. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 553–559, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.041>

DE OLIVEIRA CRISANTO. K.; DE ANDRADE. W.M.; LIMA, R.H.; DE OLIVEIRA, C.M.S.; DE SOUZA, C. J.; DE LIDEMA. R.R.; DO NASCIMENTO, E.S.; CAVALCANTE, J.C. The differential mice response to cat and snake odor. **Physiology & behavior**, p. 272–279. 2015

DE OLIVEIRA, I. C. Análise comportamental e farmacológica das reações de defesa induzidas por estresse de derrota social em camundongos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita filho. Araraquara; São Paulo. 2015

DULKA, B.N.; LYNCH, J.F.; LATSKO, M.S.; MULVANY, J.L.; JASNOW, A.M. Phenotypic responses to social defeat are associated with differences in cued and contextual fear discrimination. **Behavior Processes**. v.118 p.115-22. 2015 Disponível em: doi: 10.1016/j.beproc.2015.06.009.

EDMUND, M. Defence in animals. **Harlow: Prentice Hall press**, (A longman text). 1974.

ENGLER, H.; ENGLER, A.; BAILEY, M. T.; SHERIDAN, J. F. Tissue-specific alterations in the glucocorticoid sensitivity of immune cells following repeated social defeat in mice. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 163, n. 1–2, p. 110–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885313>>. Acesso em: 4 set. 2014.

FARIA, M.; MIGUEL T.T. ; GOMES, K.S; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors, **Hormones and Behavior**, v.79 p.74-83, 2016.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 429–438, 1994.

FATURI, C. B.; RANGEL, M. J.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Functional mapping of the circuits involved in the expression of contextual fear responses in socially defeated animals. **Brain Structure and Function**, [s. l.], v. 219, n. 3, p. 931–946, 2014.

FAVORETTO, C. A.; MACEDO, G. C.; QUADROS, I. M. H. Effects of ethanol on social avoidance induced by chronic social defeat stress in mice. **Stress**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 85–91, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10253890.2017.1280667>

FEDOROFF, I. C.; TAYLOR, S. Psychological and pharmacological treatments of social phobia: A meta-analysis. **Journal of clinical psychopharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 311–324, 2001.

FRANKLIN, T. B.; SILVA, B. A.; PEROVA, Z.; MARRONE, L.; MASFERRER, M. E.; ZHAN, Y.; KAPLAN, A.; GREETHAM, L.; VERRECHIA, V.; HALMAN, A.; PAGELLA, S.; VYSSOTSKI, A. L.; ILLARIONOVA, A.; GRINEVICH, V.; BRANCO, T.; GROSS, C. T. Prefrontal cortical control of a brainstem social behavior circuit. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 260–270, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4470>

GRAEFF, F. G. Ansiedade. *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos 1999a. p. 135-178.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Revista Brasileira de pesquisa médica ebiomédica**, v. 27, n. 4, p. 811–829, 1994b.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Fundamentos da Psicofarmacologia. **Segundaed**. São Paulo: Atheneu, 2012c. v. 290p. 165–204

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Atheneu, 2004d. v. 105p. 434

GUIMARÃES, F.S.; CAROBREZ, A.P.; DE AGUILAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey, **Psychopharmacology** v.10, p. 91-94, 1991.

GILMARTIN, M. R.; BALDERSTON, N. L.; HELMSTETTER, F. J. Prefrontal cortical regulation of fear learning. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 445–464, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.004>

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2015.8>

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 508, n. 1–3, p. 147–153, 2005b.

KEENEY, A.; JESSOP, D.; HARBUZ, M.; MARSDEN, C.; HOGG, S.; BLACKBURN-MUNRO, R. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 330–38, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629831>>. Acesso em: 4 ago. 2014.

KRYPOTOS, A.-M. Avoidance learning: a review of theoretical models and recent developments. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. July, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00189/abstract>

LARRIEU, T.; SANDI, C. Stress-Induced Depression: Is Social Rank a Predictive Risk Factor? **BioEssays**, [s. l.], v. 1800012, p. 1–10, 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201800012>

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 2871–2878, 2014. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400335111>

LORIVEL, T.; ROY, V.; HILBER, P. Fear-related behaviors in lurcher mutant mice exposed to a predator. **Genes, Brain and Behavior**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 794–801, 2014.

LUKAS, M.; TOTH, I.; REBER, S. O.; SLATTERY, D. A.; VEENEMA, A. H.; NEUMANN, I. D. The Neuropeptide Oxytocin Facilitates Pro-Social Behavior and Prevents Social Avoidance in Rats and Mice. **Neuropsychopharmacology**, v.36 n.11, p.2159–2168. 2011. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/npp.2011.95>

LUMLEY, L. A.; CHARLES, R. F.; CHARLES, R. C.; HEBERT, M. A.; MORTON, D. M.; MEYERHOFF, J. L. Effects of social defeat and of diazepam on behavior in a resident-intruder test in male DBA/2 mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 433–447, 2000.

MACEDO, G. C.; MORITA, G. M.; DOMINGUES, L. P.; FAVORETTO, C. A.; SUCHECKI, D.; QUADROS, I. M. H. Consequences of continuous social defeat stress on

anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 97, n. September 2017, p. 154–161, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.007>>

MARTINEZ, R. C. R.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V. C. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTERAS, N. S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 192, n. 2, p. 185–190, 2008.

MCNAUGHTON, J. A.; GRAY, J. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders** V,61, N.3, P.161–176, 2000.

MEDURI, J. D.; FARNBAUCH, L. A.; JASNOW, A. M. Paradoxical enhancement of fear expression and extinction deficits in mice resilient to social defeat. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 256, p. 580–590, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.009>

MINEKA, S.; OEHLBERG, K. The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. **Acta Psychologica**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 567–580, 2008.

NUTT, D. J. The Pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 233–266, 1990.

POLANCO, L.; VARGAS, C. Adquisición de la respuesta de congelamiento en ratas: diferencias sexuales en adolescentes y adultos. **Suma Psicológica**, 18 (2), 127-137. (2011).

PERROT-MINNOT, M. J.; BANCHETRY, L.; CÉZILLY, F. Anxiety-like behaviour increases safety from fish predation in an amphipod crustacea. **Royal Society Open Science**, [s. l.], v. 4, n. 12, 2017.

PINEL, J. P. J.; MUMBY, D. G.; DASTUR, F. N.; PINEL, J. G. Rat (*Rattus norvegicus*) defensive behavior in total darkness: Risk-assessment function of defensive burying. **Journal of Comparative Psychology**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 140–147, 1994. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7036.108.2.140>>

PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 149–181, 1992.

QIAO, B.; LI, C.; ALLEN, V. W.; SHIRASU-HIZA, M. M.; SYED, S. Automated analysis of long-term grooming behavior in *Drosophila* using a k-nearest neighbors classifier. **eLife**, [s. l.], v. 7, p. e34497, 2006. Disponível em: <https://elifesciences.org/articles/34497>

QUINN, J.J.; FANSELOW, M.S. Defenses and memories: Functional neural circuitry of fear and conditional responding. em M.G. Craske, D. Hermans & D. Vansteenwegen (Eds.), *Fear and learning: From basic processes to clinical implication*. p. 55-74. Washington, Dc .US: **American Psychological Association**.  
<http://dx.doi.org/10.1037/11474-003>

RAZZOLI, M.; DOMENICI, E.; CARBONI, L.; RANTAMAKI, T.; LINDHOLM, J.; CASTRÉN, E.; ARBAN, R. A role for BDNF/TrkB signaling in behavioral and physiological consequences of social defeat stress. **Genes, Brain and Behavior**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 424–433, 2011.

RIAD-ALLEN, L.; VAN DER KOOY, D. Social defeat stress switches the neural system mediating benzodiazepine conditioned motivation. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 127, n. 4, p. 515–523, 2013.

ROBAYO, B. Aprendizaje Social y Aprendizaje no Social: una Comparación a Partir de la Teoría de Sistemas. Conductuales. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Mexico. 2013

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: An ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 289–304, 1997a.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Acute Non-opioid Analgesia in Defeated Male Mice. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 36, p. 947–950, 1986b.

SORROGOTTI, A. A.; CIPRIANO, F.C.; CRUZ, D.C.; MASCARENHAS, R.J.; RODGERS, R.L.; NUNES-DE-SOUZA, Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze, **Behavioural Brain Research**, v, **338**, p, **159-165** ,**2018** .

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological review**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.

STAPLES, L. G. Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiology of Learning and Memory**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 435–445, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.009>

TEJADA, J.; TAVERNA C, K.; MORATO, S. X-PloRat : A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces X-PloRat : Software para o Registro do Comportamento em



Espaços Confinados. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, [s. l.], v. 33, p. 1–4, 2017.

TOTH, I.; NEUMANN, I. D. Animal models of social avoidance and social fear. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 354, n. 1, p. 107–118, 2013.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3945>

VARMAN, D. R.; RAJAN, K. E. Environmental enrichment reduces anxiety by differentially activating serotonergic and neuropeptide y (NPY)-ergic system in Indian field mouse (*Musbooduga*): An animal model of post-traumatic stress disorder. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1–23, 2015.

VALZELLI, L. Animal models of behavioral pathology and violent aggression. **Methods Find Expation Clinic Pharmacological**, v. 7, n. 4, p. 189–193. 1985.

VENZALA, E.; GARCÍA-GARCÍA, A. L.; ELIZALDE, N.; DELAGRANGE, P.; TORDERA, R. M. Chronic social defeat stress model: Behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 224, n. 2, p. 313–325, 2012.

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C. M.; HUBBARD, D. T.; WEBSTER, D.; WALL, P. M.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. The rat exposure test: A model of mouse defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 465–473, 2004.

ZHUKOVSKAYA, M.; YANAGAWA, A.; FORSCHLER, B. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. **Insects**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 609–630, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2075-4450/4/4/609/>

### Anexo 1. Animais expostos a maravalha nova ou familiar.

Tendo em conta os dados da literatura, foi observado que a maravalha poderia ser uma pista ambiental importante para a aversão contextual (FAVORRETO;MACEDO;QUADRADO,2018), portanto, foi feito um experimento piloto com o objetivo de determinar a importância dos sinais olfativos. Animais socialmente derrotados (expostos ao coespecífico agressor) ou controle (exposto ao com específico não agressor) foram expostos a maravalha nova (sem sinais olfativos) ou familiar (da caixa moradia do agressor ou coespecífico). Desta maneira, os animais foram expostos as mesmas condições experimentais que no experimento 1.

Por meio deste protocolo foi observado que os animais derrotados e expostos a maravalha do agressor tem uma diminuição significativa de tempo de permanência na superfície, em comparação com a Hab e em comparação com os animais derrotados expostos a maravalha nova. Já, em relação aos animais que foram expostos a coespecífico não agressor, não se observou uma diferença entre os grupos. Igualmente não se encontrou diferença quando eram comparados os animais derrotados versus os animais controle. Pode-se concluir que a maravalha com cheiro do agressor seria um sinal olfativo importante para gerar aversão contextual, mas ainda não é suficientemente robusta.

Figura 11. Tempo de permanência de animais expostos a maravalha nova ou do coespecífico.

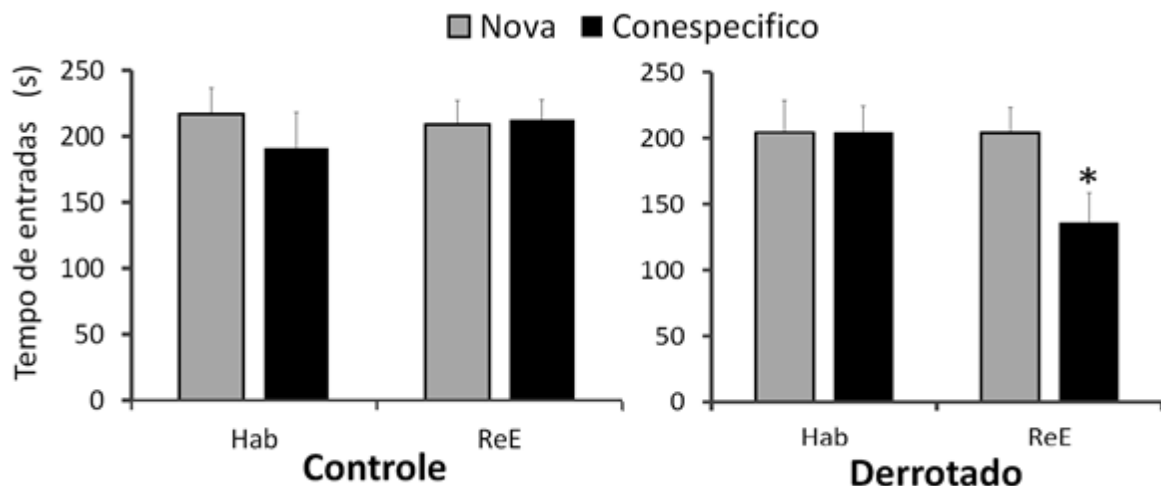


Figura 11. Tempo de permanência na superfície em animais de grupo controle e grupo derrotado que foram expostos a maravalha nova ou familiar.