



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA**

**AVERSÃO AO CONTEXTO ASSOCIADO AO ESTRESSE DE DERROTA  
SOCIAL EM CAMUNDONGOS: UM ESTUDO ETOLÓGICO**

Ariela Maltarolo Crestani

Araraquara, SP

- 2015 -

**Ariela Maltarolo Crestani**

**AVERSÃO AO CONTEXTO ASSOCIADO AO ESTRESSE DE DERROTA  
SOCIAL EM CAMUNDONGOS: UM ESTUDO ETOLÓGICO**

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

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

**Araraquara, SP**

**- 2015 -**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C922a Crestani, Ariela Maltarolo  
Aversão ao contexto associado ao estresse de  
derrota social em camundongos : um estudo etológico /  
Ariela Maltarolo Crestani. -- São Carlos : UFSCar,  
2015.  
48 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Ansiedade. 2. Ansiedade social. 3. Modelos  
animais. 4. Condicionamento contextual. 5. Análise  
fatorial. I. Título.



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ariela Maltarolo Crestani, realizada em 01/04/2015:

---

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

---

Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho  
USP

---

Profa. Dra. Rosana Mattioli  
UFSCar

*“Se enxerguei mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes” – Isaac Newton*

### **Agradeço:**

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pela orientação e ensinamentos valiosos.

Aos meus pais, irmão, avô e avó por compreenderem minha ausência e sempre me apoiarem nas minhas decisões, me dando uma injeção de ânimo e motivação sempre que precisava. Amo vocês!

Ao meu namorado Marcos pela paciência e compreensão, pelos conselhos, companheirismo e por nunca duvidar do meu potencial. Seu apoio foi essencial durante essa etapa; obrigada!

Aos meus amigos de infância Bia, Carol, Dayane, Júnior e Marina, por sempre estarem presentes de uma maneira ou de outra, pelas conversas, amizade e apoio ao longo desses anos!

Aos professores da banca examinadora, pela disposição para leitura dessa dissertação.

A Ana e Tati por me acolherem tão bem e me ensinarem os primeiros passos daquela nova etapa que eu iniciava. Obrigada pela paciência, pelas dicas, ensinamentos, discussões riquíssimas sobre os resultados, mas principalmente pela amizade que me proporcionaram!

Aos meus companheiros e amigos de laboratório: Diego, Matheus, Adrielle, Nathália, Leandro, Jefferson, Josi, Jonas, Lucas, William, Lígia, Gessynger, Paula, Sheila e Paulão, agradeço por sempre dividirem as alegrias e as dificuldades, pelas reuniões, jogos, almoços e jantares sempre renovadores!

Aos professores Carlos, Marcelo e Cléo pela convivência e ensinamentos.

À Elisabete (Bete), Rosana (Rô) e Tirene (Ti) pela dedicação e trabalho impecável sempre realizado. A jornada fica muito mais fácil quando temos pessoas tão competentes e adoráveis como vocês ao nosso lado!

Ao Alexandre (UFSCar) e Cláudia (UNESP) pela assistência prestada na secretaria do PIPGCF.

À FCFar/UNESP pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF – UFSCar/UNESP) pela oportunidade.

Ao Conselho de Pós-Graduação do PIPGCF que durante minha participação como representante discente me proporcionou muito conhecimento à respeito da dinâmica de um programa de pós-graduação.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para desenvolver e divulgar este trabalho.

## Resumo

As interações agressivas entre animais co-específicos têm sido amplamente utilizadas como uma fonte etológica de estresse social para se estudar alguns aspectos da ansiedade social. Por meio deste trabalho, nós utilizamos um novo protocolo experimental com objetivo de desenvolver um novo paradigma comportamental para o estudo da ansiedade social. Camundongos foram expostos a um aparato adaptado a partir do teste de exposição ao rato (TER) e este era composto por três regiões interconectadas: toca, túnel e a superfície. Os animais foram expostos ao aparato experimental por cinco dias consecutivos, sendo os três primeiros dias para habituação ao aparato (habituação 1, 2 e 3) e no quarto dia ocorria a interação social entre co-específicos (não agressiva para os animais do “grupo não derrotado” e agressiva para os animais do “grupo derrotado”). No quinto e último dia experimental os animais eram reexpostos ao aparato durante 10 minutos e os seguintes comportamentos eram avaliados: tempo de permanência e frequência de entrada nas três regiões do aparato (toca/túnel/superfície), frequência do comportamento *stretched attend posture* (SAP) nas três regiões do aparato, tempo realizando o comportamento de auto-limpeza nas três regiões do aparato, frequência de levantamento na superfície e latência em segundos para o animal adentrar a superfície após ser reexposto ao aparato. A análise fatorial foi empregada neste estudo com objetivo de traçar o perfil comportamental de camundongos socialmente derrotados (N=90) quando reexpostos ao aparato experimental onde a interação agressiva ocorreu; nós também comparamos o perfil comportamental de camundongos não derrotados (GND, N=89) e socialmente derrotados (GD, N=90) quando reexpostos ao contexto onde a interação social (não agressiva ou agressiva) ocorreu por meio do Teste *t* de Student. A análise fatorial final apresentou quatro fatores que juntos representam 72,09% da variância total: o fator 1 foi

carregado com o tempo gasto na toca e na superfície do aparato, além do tempo realizando auto-limpeza na toca; enquanto o fator 2 foi carregado com tempo gasto no túnel e o total de entradas nos três compartimentos do aparato (toca, túnel e superfície). O fator 3 foi carregado com a frequência de *SAP* no túnel e na superfície; e o fator 4 foi carregado apenas com a latência para atingir a superfície. O teste *t* de Student indicou que camundongos socialmente derrotados levaram mais tempo para atingir a superfície do aparato e passaram mais tempo realizando auto-limpeza na toca quando comparados aos camundongos não derrotados. Juntos, esses resultados sugerem que o aumento na latência para atingir a superfície e no tempo realizando auto-limpeza na toca foram condicionados ao contexto por meio de uma única derrota social, entretanto não houve condicionamento para medidas clássicas tais como aversão espacial e medidas de avaliação de risco (como o *SAP*).

## Abstract

Aggressive interactions between conspecific animals have been used as an ethological source of social stress to study some aspects of social anxiety. Through this work we used a new experimental protocol in order to develop a new behavioural paradigm in the study of social anxiety. Mice were exposed to an apparatus adapted from rat exposure test (RET) and it consisted of three interconnected regions: home chamber, tunnel and surface area. Animals were exposed to the experimental apparatus for five consecutive days, being the first three days for habituation to the apparatus (habituation 1, 2 and 3) and on the fourth day occurred the social interaction between conspecifics (not aggressive for animals from "non-defeated group" and aggressive for animals from "defeated group"). On the fifth and final experimental day the animals were re-exposed to the apparatus for 10 minutes and the following behaviors were assessed: frequency of entries and time spent in the three regions of the apparatus (home chamber/tunnel/surface area), frequency of the stretched attend posture (SAP) behaviour in the three regions, time spent on self-grooming in the three regions, frequency of rearing in the surface area and latency to reach the surface area once the animals were re-exposed to the experimental apparatus. Factor analysis was used in this study to trace the behavioural profile of socially defeated mice (n=90) when re-exposed to the apparatus where the aggressive interaction occurred; we also compared the behavioural profile of non-defeated (n=89) and defeated (n=90) mice when re-exposed to the context where social (non-aggressive or aggressive) interaction occurred, using Student's *t* test. Final factor analysis yielded 4 factors that together represent 72.09% of total variance: factor 1 was loaded with time spent in the home chamber and in the surface area and self-grooming in the home chamber, while factor 2 loaded on time spent in the tunnel and total entries in the three compartments of the apparatus (home

chamber, tunnel and surface area). Factor 3 was loaded with SAP frequency in the tunnel and in the surface area; and factor 4 was loaded only with latency to reach the surface area. Student's *t* test showed that socially defeated mice spent more time to reach the surface area and performing self-grooming in the home chamber when compared to non-defeated mice. Together, these results suggest that the increase in the latency to reach the surface area and self-grooming in the home chamber were conditioned to a single social defeat, but there were no conditioning for classical measures such as: place aversion and risk assessment behaviour (SAP).

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>12</b>
1.1. Estresse social e ansiedade .....	12
1.2. Ansiedade social e modelos animais .....	16
1.3. Análise Fatorial .....	21
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>23</b>
3.1. Animais.....	23
3.2. Escolha do Agressor .....	23
3.3. Aparato experimental .....	24
3.4. Procedimentos experimentais .....	24
3.4.1. Análise 1: Análise fatorial .....	26
3.4.2. Análise 2: Avaliação do condicionamento contextual em camundongos socialmente derrotados. ....	27
3.4.3. Análise estatística .....	27
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
4.1. Análise 1: Análise fatorial .....	28
4.2. Análise 2: Condicionamento contextual moderado em camundongos socialmente derrotados. ....	31
<b>5. Discussão.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>42</b>



## 1. Introdução

### 1.1. Estresse social e ansiedade

Diversas espécies de animais, incluindo os seres humanos, vivem em ambientes sociais altamente complexos e com hierarquias bem estabelecidas. Dentro desse contexto, os membros de um grupo social apresentam diferentes tipos de interações entre si; enquanto alguns indivíduos são menos expostos a interações agressivas, outros enfrentam níveis altos e persistentes de agressão e esta representa uma fonte intensa de estresse social (MARTINEZ; PHILLIPS; HERBERT, 1998).

Animais submetidos a interações agressivas com co-específicos e que se reconhecem submissos apresentam várias alterações fisiológicas e comportamentais (MARTINEZ; PHILLIPS; HERBERT, 1998). Dentre as alterações fisiológicas destacam-se (a) a ativação de sistemas neuroendócrinos como eixo hipotálamo – pituitária – adrenal (eixo HPA) e eixo hipotálamo – pituitária – gônadas (eixo HPG) (HERBERT, 1987), as quais causam, respectivamente, elevação de níveis plasmáticos dos hormônios adrenocorticotrofina (ACTH), cortisol, corticosterona,  $\beta$ -endorfina e redução de hormônios andrógenos (BLANCHARD et al., 1995; HUHMAN et al., 1990; RAAB et al., 1986); (b) aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, alterações do ritmo circadiano da frequência cardíaca e da temperatura corpórea (TORNATZKY; MICZEK, 1993); (c) prejuízo na função imunológica e redução da resistência dos indivíduos a doenças (BEDEN; BRAIN, 1982; FLESHNER et al., 1989; HARDY et al., 1990). A derrota social também apresenta consequências sobre o comportamento dos animais, tais como: redução do comportamento de exploração no paradigma de campo aberto (KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; RAAB et al., 1986); inibição do comportamento agressivo e sexual, aumento do comportamento de submissão (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1994;

KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; VAN DE POLL et al., 1982; YOSHIMURA; KIMURA, 1991); e aumento de medidas indicadoras de ansiedade no labirinto em cruz elevado (RODGERS et al., 1995).

A ansiedade é caracterizada como um estado emocional qualificado subjetivamente como desagradável, acompanhado por sentimento de apreensão, insegurança e um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais (NUTT, 1990). Para Schmitt e Kapczinski (2004), a ansiedade pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência da espécie humana e parece ser um consenso que esse estado emocional confere valor adaptativo entre as diversas espécies.

Nas últimas décadas têm ocorrido progressos significativos no conhecimento da estrutura dos sistemas neurais relacionados com os estados de ansiedade (BRAGA, 2010). Pesquisas pré-clínicas apontam que os estados de ansiedade em humanos apresentam correlações com os mecanismos de defesa de animais quando diante de estímulos ameaçadores ou situações de perigo (BRAGA, 2010). Sabe-se que tais comportamentos de defesa envolvem dois sistemas encefálicos que apresentariam papel fundamental na ansiedade: o sistema cerebral de defesa (SCD) e o sistema de inibição comportamental (SIC) (GRAEFF; HETEM, 2004).

O sistema cerebral de defesa (SCD) engloba um conjunto de estruturas nervosas que se dispõem longitudinalmente no encéfalo, composto pela amígdala, hipotálamo medial (HM) e matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A amígdala estabelece conexões com o neocórtex e estruturas mais profundas do sistema límbico, atuando como uma interface sensorio-emocional. Assim, esta estrutura é responsável por avaliar e classificar o tipo e o grau do estímulo em questão e então transmiti-lo para HM e MCP (GRAEFF; HETEM, 2004; TEIXEIRA-SILVA et al., 2004). A MCP seleciona e organiza reações comportamentais e fisiológicas de defesa apropriadas, ao passo que

HM regula o funcionamento da hipófise. Esta última, por meio da liberação do hormônio corticotrófico (ACTH), estimula o córtex das adrenais a sintetizar e secretar glicocorticóides (cortisol). O cortisol promove ações catabólicas em seus tecidos alvos de maneira a aumentar a disponibilidade energética para o desenvolvimento de respostas frente ao estímulo/situação em questão (GRAEFF; HETEM, 2004).

O sistema de inibição comportamental (SIC) tem como principal substrato neural o sistema septo-hipocampal, o qual pode ser ativado pela exposição do animal a sinais condicionados, sinais de punição, frustração, exposição a estímulos ameaçadores ou a situações novas. Quando ativado, o sistema septo-hipocampal provoca inibição de qualquer movimento que o animal esteja realizando, além de aumentar seu nível de vigilância e atenção, preparando-o para iminente ação vigorosa (GRAEFF; HETEM, 2004). Quando o estímulo ao qual o animal foi exposto é compatível com a situação esperada, o sistema septo-hipocampal apresenta-se em estado de checagem e o controle comportamental não é exibido pelo SIC; entretanto quando o estímulo ao qual o animal é exposto não é compatível com a situação esperada, o sistema septo-hipocampal apresenta-se em estado de controle e o SIC gera a inibição comportamental, tendo como resultado final o aumento da vigilância e atenção ao meio ao qual o animal encontra-se exposto (GRAEFF, 1994; TEIXEIRA-SILVA et al., 2004).

Em 2000, os pesquisadores Jeffrey Gray e Neil McNaughton desenvolveram uma nova proposta, a qual sintetizou as evidências disponíveis sobre o SIC e SCD em um terceiro elemento: o sistema cerebral de aproximação (SCA). Esse novo sistema proposto é encarregado de dirigir o animal a objetos que satisfaçam demandas biológicas, como busca por alimento e sexo, cujo consumo é prazeroso. Anatomicamente, o SCA compreende o sistema dopaminérgico ascendente que inerva o núcleo *accumbens*, o qual desempenha papel importante na fisiopatologia da

esquizofrenia e dependência psicológica a drogas. Por meio dessa nova proposta, o estado de ansiedade passa a ser definido como uma emoção resultante de um conflito, no caso, o clássico conflito aproximação-esquiva e o papel de detectar conflito entre o SCD e o SCA é atribuído ao septo-hipocampo. Uma vez em ação, este detector promove as mesmas manifestações atribuídas anteriormente ao SIC, como inibição da atividade corrente, aumento da vigilância e direção da atenção a fontes potenciais de perigo. Entretanto, uma função adicional é atribuída a esse complexo; a capacidade de enviesar a decisão para a esquiva, resolvendo assim o impasse entre impulsos contrários, optando pela proteção do organismo de possível dano. Por meio desse construto teórico é possível estabelecer uma clara distinção entre ansiedade e medo (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Até um determinado nível a ansiedade pode favorecer o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, mas passa a ser indesejada, ou patológica, quando interfere com o comportamento normal do indivíduo (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). A patologia é definida a partir do momento em que o sofrimento provocado pela ansiedade trazer prejuízo à pessoa, em função de comportamentos de fuga e esquiva de situações importantes da vida acadêmica, social e profissional do indivíduo (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). Nesse caso, as reações manifestadas são denominadas Transtornos de Ansiedade e são consequências de disfunções nos sistemas encefálicos que modulam as reações de defesa (BRAGA, 2010).

Dados do Estudo Multicêntrico Brasileiro de Morbidade Psiquiátrica (EMB), realizado em três áreas urbanas (Brasília, São Paulo e Porto Alegre), utilizando os critérios diagnósticos do DSM-III (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders III) (ALMEIDA-FILHO et al., 1992, 1997), constataram que a ansiedade e as fobias constituem os principais problemas de saúde mental da população brasileira, com

prevalências globais variando de 8% a 18%. Segundo dados estatísticos brasileiros, até o ano de 2011, 15.626 brasileiros receberam aposentadoria em decorrência de transtornos mentais e comportamentais, o que resulta em um gasto anual de mais de 17 milhões de reais. Neste mesmo ano, 198.743 brasileiros receberam auxílio pelo mesmo motivo, com custo anual de quase 197 milhões de reais (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL, 2011). Ainda, de acordo com Lepine (2002), os transtornos de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais prevalentes na população. Dessa maneira, tais transtornos contribuem com grande parcela dos gastos governamentais com auxílios a indivíduos afetados por transtornos mentais e de comportamento.

De acordo com a quinta versão do Manual de Estatística e Diagnóstico das Doenças Mentais (DSM-V, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V*), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association*, 2013) e a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, 1982), os transtornos de ansiedade estão classificados em categorias diagnósticas, que são agrupadas em cinco grupos de transtornos: transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos fóbicos, e transtorno de estresse pós-traumático.

## **1.2. Ansiedade social e modelos animais**

O transtorno de ansiedade social, também chamado de fobia social no DSM-V, é atualmente reconhecido como um transtorno de ansiedade com prevalência significativa, consideráveis comorbidades e sérias consequências (RAJ; SHEEHAN, 2001; TOTH; NEUMANN, 2013). Trata-se do terceiro transtorno psiquiátrico

incapacitante mais comum, superado apenas pelo abuso de substâncias e transtorno depressivo maior (KESSLER et al., 1994).

A principal característica do transtorno de ansiedade social é o medo excessivo de ser examinado e avaliado negativamente por outras pessoas na vida social. A condição é tipicamente relatada em situações tais como: falar em frente a grupos pequenos ou grandes de pessoas, conversar com desconhecidos ou pessoas com autoridade, ter que ser assertivo, ter que confrontar comportamentos de outras pessoas, namorar, participar de festas, utilizar banheiro público, ser observado enquanto come, escreve ou trabalha. Em alguns casos, a reação à situação fóbica manifesta-se como ataques de pânico (RAJ; SHEEHAN, 2001).

Os melhores resultados de tratamentos para esse transtorno são obtidos por meio de terapia cognitivo-comportamental (FEDOROFF; TAYLOR, 2001), a qual geralmente é combinada com medicamentos inespecíficos originalmente desenvolvidos para depressão e transtornos generalizados de ansiedade, tais como antidepressivos, beta-bloqueadores e benzodiazepínicos (TOTH; NEUMANN, 2013). Dados sugerem que o tratamento farmacológico crônico de pacientes com transtorno de ansiedade social melhora continuamente o quadro sintomatológico e que o índice de reincidência é alto após interrupção do uso dos medicamentos, de maneira que o tratamento crônico mostra-se como uma alternativa interessante para o tratamento desse transtorno (VAN VLIET; DEN BOER; WESTENBERG, 1994). Assim como muitos outros transtornos de ansiedade, o transtorno de ansiedade social é provavelmente causado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, incluindo traços herdados, desequilíbrio de neurotransmissores, atividade encefálica alterada e eventos cotidianos negativos (TOTH; NEUMANN, 2013).

A alta prevalência dos transtornos de ansiedade, bem como seus sintomas incapacitantes têm impulsionado estudos para a compreensão de suas bases neurais e para a análise pré-clínica de potenciais fármacos para o tratamento desses transtornos. Os modelos animais constituem o eixo central das pesquisas pré-clínicas da neurobiologia das desordens psiquiátricas e são empregados tanto como ferramentas de triagem na busca de novos agentes terapêuticos, quanto como simulações para buscar conhecer quais os mecanismos responsáveis por determinados comportamentos emocionais (FILE, 1992; GREEN; HODGES, 1991; GRIEBEL, 1995; HANDLEY, 1991; LISTER, 1990; RODGERS; DALVI, 1997; STEPHENS; ANDREWS, 1991; TREIT, 1994). Atualmente, são utilizados mais de 30 modelos animais de ansiedade, embora alguns se baseiem em respostas fisiológicas (hipertermia) ou endócrinas (medição de corticosterona plasmática) ao estresse, a maioria se baseia em comportamentos naturais (RODGERS et al., 1997).

Os modelos comportamentais são convenientemente classificados em respostas condicionadas (esquiva ativa/passiva, testes de conflito, aversão condicionada ao sabor) ou incondicionadas (exposição ao campo aberto, labirinto em cruz elevado, exploração livre) ao estímulo (RODGERS et al., 1997).

Do ponto de vista comportamental, já é bem estabelecido que os animais são capazes de apresentar diversas reações de defesa em resposta a ameaças externas, por exemplo, quando há exposição a um predador ou um agressor co-específico (EDMUNDS, 1974). Em mamíferos, como ratos, tais comportamentos classicamente compreendem congelamento (*freezing*), fuga, ataques defensivos e até mesmo simulação de morte (imobilidade tônica), sendo que tais respostas são dependentes tanto da iminência da ameaça (RATNER, 1967) quanto da oportunidade de fuga (BLANCHARD et al., 1990).

Ademais, em situações de perigo potencial (por exemplo, quando o animal avista um predador, mas o mesmo já não se encontra mais presente) tem sido descrito que ratos de laboratório (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989) e camundongos (BLANCHARD et al., 1995) apresentam um grupo de comportamentos coletivamente denominados como “avaliação de risco”. Tais respostas originalmente identificadas em sistemas de tocas construídas de maneira especial são caracterizadas por aproximações cuidadosas até a superfície onde anteriormente localizava-se um predador: i) exploração cuidadosa de áreas perigosas como nas entradas dos túneis, ii) posturas de esticar o corpo (*stretched attend posture – SAP*) e/ou de andar agachado (*flatback*) direcionadas para áreas de perigo e iii) apresentação de comportamentos de *SAP* e/ou *flatback* quando os animais reentram na área de perigo.

Diversos modelos animais têm sido apresentados na tentativa de elucidar melhor o desenvolvimento do transtorno de ansiedade social (RAJ; SHEEHAN, 2001). Todos eles baseiam-se na preferência de roedores em passar tempo com outro animal co-específico ao invés de ficar só ou na preferência de explorar estímulos sociais em vez de não sociais (BERTON et al., 2006; FILE; HYDE, 1978; LUKAS et al., 2011).

Nesse sentido, um estressor social, sob a forma de experiência de derrota, é um estímulo potente na ativação de mecanismos de defesa (RODGERS; RANDALL, 1986a). Com evidências tanto comportamentais (RODGERS; RANDALL, 1986b) quanto farmacológicas (RODGERS; RANDALL, 1987, 1988; RODGERS; SHEPHERD, 1989, 1992; RODGERS, 1995) é possível sugerir que a ansiedade é um fator chave nas reações de defesa antecipatórias. Em confirmação desta hipótese, em camundongos, a derrota social (e, em menor extensão, a exposição ao odor de um macho agressivo coespecífico) imediatamente antes da exposição do animal ao labirinto

em cruz elevado produziu um efeito ansiogênico significativo (RODGERS; COLE, 1993).

Charles Darwin (1872 apud BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991), em “A expressão das emoções no homem e nos animais”, talhou um fundamento importante para a visão que temos hoje de que padrões defensivos de outras espécies são como precursores evolutivos das reações de ansiedade e medo em humanos. Mais recentemente, diversos estudos clínicos conceituaram os transtornos de ansiedade em humanos como transtornos de defesa (BECK, 1976; CLARK, 1989; DEAKIN; GRAEFF, 1991; KIDMAN, 1989), nos quais o fundamento do distúrbio é a ativação inapropriada de comportamentos defensivos decorrente da avaliação equivocada da fonte de perigo. Assim sendo, a compreensão da neurobiologia dos comportamentos defensivos assume uma importância particular no estudo da ansiedade e, nesse contexto, estudos demonstram que existe uma notável similaridade entre os vertebrados quanto aos seus sistemas neurais (amígdala, matéria cinzenta periaquedutal) envolvidos na detecção de perigo e produção da resposta defensiva (DAVIS, 1992; DEPAULIS; BANDLER, 1991). Sendo esses sistemas fortemente conservados evolutivamente, é possível afirmar que podemos aprender muito sobre reações ao medo e de defesa humanas a partir de estudo com outras espécies (LEDOUX, 1995).

Levando em consideração a alta prevalência dos transtornos de ansiedade social em humanos, o pouco entendimento de sua patologia e a escassa disponibilidade de modelos animais eficazes para o seu estudo, faz-se importante o desenvolvimento de novas ferramentas metodológicas que busquem entender melhor a neurobiologia dos transtornos de ansiedade social e que permitam a busca por novos tratamentos para essa patologia.

O paradigma comportamental proposto neste trabalho busca, por meio do uso de uma fonte etológica e biologicamente relevante de estresse (interação agressiva entre co-específicos), descrever quais as respostas comportamentais apresentadas por camundongos socialmente derrotados e reexpostos ao contexto em que tiveram a interação agressiva com um co-específico; de maneira a avaliar se ocorre o condicionamento de respostas comportamentais ao contexto em que os animais foram socialmente derrotados.

### **1.3. Análise Fatorial**

A análise fatorial é um recurso estatístico cuja função é reduzir uma grande quantidade de variáveis, que se correlacionam entre si, em um número menor de variáveis (denominadas fatores). Assim sendo, ao se detectar alta correlação (positiva ou negativa) entre algumas variáveis, estas podem ser representadas como um fator (FIGUEIREDO FILHO; DA SILVA JÚNIOR, 2010; LACERDA, 2006). Os resultados finais da análise fatorial são expressos pelo peso (*loading*) das variáveis em cada fator extraído, sendo que este peso representa o grau de correlação entre a variável e o fator. Peso 1,0 representa uma correlação perfeita entre a variável e o fator em questão, enquanto um peso  $<0,4$  representa uma baixa correlação (BOERNGEN-LACERDA; SOUZA-FORMIGONI, 2000; FIGUEIREDO FILHO; DA SILVA JÚNIOR, 2010). Esta técnica tem sido amplamente utilizada em modelos animais para investigar a relação entre as variáveis comportamentais estabelecidas em um etograma, dessa forma por meio desse recurso estatístico faz-se possível traçar o perfil comportamental de animais em novos paradigmas comportamentais.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral; realizar uma análise etológica de um paradigma de aversão ao contexto gerada por interação agressiva, em camundongos, com vistas ao estabelecimento e validação de uma nova ferramenta metodológica para estudo da ansiedade social.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Investigar e traçar, por meio de análise fatorial, o perfil comportamental de camundongos socialmente derrotados quando reexpostos ao aparato experimental em que previamente sofreram a interação agressiva.
  
- Avaliar se uma única derrota social é capaz de gerar condicionamento de medidas comportamentais ao contexto em que os animais previamente sofreram interação agressiva com um co-específico.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Suíços machos (30-35g) provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais eram alojados em caixas-moradias (41 cm x 34 cm x 16 cm) em grupos de 10 indivíduos e foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 7 h e apagadas às 19 h). Todos os camundongos eram experimentalmente ingênuos e as sessões experimentais foram realizadas durante a fase clara do ciclo (08:00 – 14:00 h). Os animais tiveram livre acesso a alimento e água, exceto durante os curtos períodos de teste.

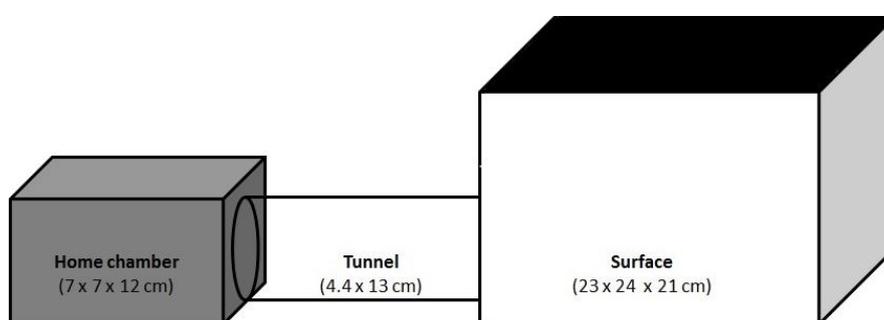
Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo tiveram início após a aprovação desse projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, protocolo CEP/FCF/CAr nº 47/2013.

#### **3.2. Escolha do Agressor**

Após a chegada ao biotério local do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, os animais foram alojados em grupos de 15 sujeitos em gaiolas viveiro (45 x 28 x 13 cm). No período de habituação às condições locais, um observador identificou os camundongos dominantes de cada gaiola (definido como o sujeito que exhibe comportamentos espontâneos de agressão aos demais da gaiola), que foram isolados em gaiolas individuais (28 x 17 x 12 cm) por, no mínimo, 4 semanas, para intensificar o comportamento agressivo (VALZELLI, 1985).

### 3.3. Aparato experimental

O aparato experimental empregado neste estudo foi adaptado a partir do “teste de exposição ao rato” originalmente desenvolvido e validado por Yang et. al (2004) (Figura 1). O aparato apresenta três câmaras conectadas entre si: toca (7 x 7 x 12 cm), túnel (4,4 cm de diâmetro, 13 cm de comprimento e 1,5 cm acima do assoalho) e superfície (23 x 24 x 21 cm); de maneira a avaliar medidas comportamentais de avaliação de risco e medidas espaço-temporais.



**Fig. 1.** Esquema do aparato experimental composto pela toca, túnel e superfície.

### 3.4. Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro, sob iluminação da uma lâmpada de 100W (iluminação de 24 lux no assoalho do aparato). O aparato experimental era higienizado com álcool 20% e seco com toalhas de papel entre os testes. Para os registros experimentais, utilizou-se uma câmera horizontal acoplada a monitor de vídeo e DVD. Os comportamentos apresentados pelos camundongos durante os testes foram analisados e quantificados por um observador treinado sem conhecimento prévio das condições experimentais de cada indivíduo (confiabilidade  $\geq 0,90$ ). As análises comportamentais foram realizadas por meio do software “X-plo-rat 2005”, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Dr. Silvio

Morato na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (o software pode ser adquirido sem custos no link <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>).

Os parâmetros comportamentais avaliados compreendiam medidas espaço-temporais e medidas complementares. Medidas espaço-temporais são representadas pela frequência de entrada e tempo gasto em cada uma das regiões do aparato (toca, túnel e superfície), além da latência em segundos para se atingir a superfície. As medidas complementares compreendem a frequência de *stretched attend posture* (SAP; comportamento de avaliação de risco em que o animal projeta seu corpo para frente utilizando apenas as patas dianteiras enquanto as patas posteriores permanecem na posição inicial do animal, de maneira que o animal retorna a sua posição original), frequência de levantamento (*rearing* – comportamento no qual o animal eleva-se sobre as patas posteriores, permanecendo na posição vertical), duração em segundos do comportamento de auto-limpeza (comportamento de cuidado com a superfície do corpo, geralmente segue uma projeção cefalo-caudal: patas dianteiras – focinho e face – cabeça – corpo – patas posteriores – cauda/genitais (EDMUNDS, 1974). O procedimento experimental consiste de cinco dias experimentais consecutivos, divididos nas seguintes fases:

*Fase 1: Habituação.* O procedimento de habituação ocorreu durante os três primeiros dias experimentais do protocolo, com intervalo de 24hrs entre cada habituação. Durante a habituação cada camundongo era posicionado na toca e podia explorar livremente o aparato inteiro vazio durante 10 minutos.

*Fase 2: Interação social.* No quarto dia experimental, cada camundongo era individualmente posicionado na toca e podia explorar livremente o aparato vazio. Assim que o animal atingisse a superfície, fechava-se a passagem entre a superfície e o túnel,

de maneira a confinar o indivíduo nessa última região. Uma vez confinados, os animais do grupo não derrotado (GND) permaneciam na superfície com um co-específico conhecido e não agressivo (habitante da sua mesma caixa moradia) durante cinco minutos, de maneira que não ocorresse interação agressiva entre os animais. Os animais do grupo derrotado (GD) eram confinados na superfície com camundongo agressor de maneira que ocorresse interação agressiva entre eles. A interação agressiva era interrompida quando o experimental apresentasse postura de submissão (elevar o corpo sobre as patas traseiras, estender as patas dianteiras na direção do agressor, retraindo a cabeça e arquear as orelhas (MICZEK, 1983)) por pelo menos 5 segundos ou após 5 minutos (o que ocorresse primeiro).

*Fase 3: Teste de reexposição.* No quinto dia experimental, os camundongos eram individualmente posicionados na toca e podiam explorar livremente o aparato sem a presença de nenhum outro camundongo e os comportamentos previamente descritos foram registrados durante 10 minutos de sessão de teste.

### **3.4.1. Análise 1: Análise fatorial**

Com o propósito de compreender as relações entre os comportamentos apresentados por camundongos socialmente derrotados segundo o protocolo apresentado, os dados de 90 camundongos socialmente derrotados foram submetidos a três análises fatoriais sucessivas. Inicialmente, realizou-se análises fatoriais separadas para medidas espaço-temporais (análise 1) e para medidas complementares (análise 2), com o objetivo de compreender a estrutura comportamental e reduzir o número total de variáveis apresentadas. Os resultados dessas duas análises foram então combinados em uma terceira análise fatorial (análise 3).

### **3.4.2. Análise 2: Avaliação do condicionamento contextual em camundongos socialmente derrotados.**

Para avaliar se uma única derrota social seria capaz de provocar condicionamento contextual, comparou-se o perfil comportamental apresentado por camundongos socialmente derrotados (GD, N=90) no quinto dia experimental (fase 3, teste de reexposição) ao perfil apresentado por camundongos expostos a interações não-agressivas (GND, N=89).

### **3.4.3. Análise estatística**

Para a análise 1, as análises fatoriais foram realizadas utilizando fator de solução de componentes principais com rotação ortogonal (varimax) da matriz de fator. Esse método garante que fatores extraídos são independentes e devem, portanto, refletir fenômenos biológicos distintos. O teste de Kaiser (autovalores  $\geq 1$ ) foi utilizado para selecionar o número de fatores extraídos e as cargas fatoriais inferiores a 0,7 foram descartadas. A carga fatorial de cada comportamento (variável) indica o quanto este item se correlaciona com determinado fator. Cargas de  $\pm 1$  indicam uma correlação perfeita (positiva/negativa), enquanto cargas inferiores a 0,7 podem indicar que aquela variável está pouco associada àquele fator. Neste estudo foram utilizadas apenas cargas  $\geq 0,7$ .

Para a análise 2, todos os dados comportamentais referentes ao quinto dia experimental (fase 3, teste reexposição) foram submetidos ao Teste *t* de Student. Os valores de P foram considerados estatisticamente significantes quando  $P \leq 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Análise 1: Análise fatorial

Os resultados referentes à análise 1 estão resumidos nas Tabelas 1-4. A Tabela 1 apresenta o perfil comportamental apresentado por camundongos socialmente derrotados no teste de reexposição. Os animais apresentaram uma preferência discreta pelas áreas protegidas (toca + túnel; 53,3%) onde eles realizaram principalmente o comportamento de auto-limpeza ( $\approx 35\%$ ).

**Tabela 1.** Descrição dos comportamentos apresentados por camundongos socialmente derrotados (N=90) no teste de reexposição.

Parâmetro	Média $\pm$ SEM
<i>Tempo (s)</i>	
Toca	275,03 $\pm$ 14,17
Túnel	44,97 $\pm$ 2,44
Áreas protegidas (toca + túnel)	320,00 $\pm$ 13,29
Superfície	279,99 $\pm$ 13,30
<i>Frequência de entradas</i>	
Toca	11,49 $\pm$ 0,53
Túnel	22,21 $\pm$ 1,12
Áreas protegidas (toca + túnel)	33,69 $\pm$ 1,63
Superfície	11,66 $\pm$ 0,61
<i>Stretched Attend Posture (Freq.)</i>	
Toca	0,29 $\pm$ 0,098
Túnel	1,28 $\pm$ 0,315
Áreas protegidas (toca + túnel)	1,57 $\pm$ 0,342
Superfície	1,22 $\pm$ 0,254
<i>Auto-Limpeza (s)</i>	
Toca	112,94 $\pm$ 10,93
Túnel	0,22 $\pm$ 0,19
Áreas protegidas (toca + túnel)	113,16 $\pm$ 10,94
Superfície	23,91 $\pm$ 4,83
<i>Levantamento (Freq.)</i>	
Superfície	39,70 $\pm$ 2,08
<i>Latência para atingir a superfície (s)</i>	
Superfície	27,65 $\pm$ 8,59

Esses dados foram usados para realizar as três análises fatoriais apresentadas nas tabelas 2-4.

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise fatorial realizada apenas com medidas espaço-temporais (entradas e tempo gasto na toca, túnel e superfície; e latência

para atingir a superfície). Esta análise apresentou dois fatores que juntos representam 86,73% da variância total. O Fator 1 foi carregado com entradas nos três compartimentos do aparato ( toca, túnel e superfície) e tempo gasto no túnel, enquanto o fator 2 foi carregado com tempo gasto na toca e na superfície; e latência para atingir a superfície. Uma vez que as entradas nos três compartimentos (toca, túnel e superfície) mostram-se alta e positivamente correlacionadas entre si, conclui-se que uma medida de entradas totais poderá ser empregada como uma medida única em análises futuras. O tempo gasto na toca e na superfície carregados no fator 2 foram altamente correlacionados entre si, porém de maneira oposta e latência para atingir a superfície também foi carregada nesse fator. Faz-se importante destacar que nenhuma variável foi carregada em mais de um fator.

**Tabela 2.** Fatores ortogonais carregados para medidas espaço-temporais de camundongos socialmente derrotados no teste de reexposição.

Parâmetro comportamental	Fatores	
	1	2
Tempo na toca (s)		-0,94151
Tempo no túnel (s)	0,75821	
Tempo na superfície (s)		0,967983
Entradas na toca	0,958766	
Entradas no túnel	0,950512	
Entradas na superfície	0,920328	
Latência para atingir a superfície		0,765088
% de variância	64,98454	21,74525

Cargas fatoriais superiores a 0,7 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1,0$ .

A segunda análise fatorial (Tabela 3) foi realizada com parâmetros comportamentais complementares tais como: auto-limpeza, *SAP* e levantamento realizados nas diferentes regiões do aparato. Esta segunda análise apresentou três fatores que juntos representam 63,45% da variância total e não houveram variáveis carregadas em mais de um fator.

**Tabela 3.** Fatores ortogonais carregados para medidas complementares de camundongos socialmente derrotados no teste de reexposição.

Parâmetro comportamental	Fatores		
	1	2	3
<i>SAP</i> na toca			
<i>SAP</i> no túnel			
<i>SAP</i> na superfície		0,862503	
Auto-limpeza na toca (s)			
Auto-limpeza no túnel (s)			
Auto-limpeza na superfície (s)			0,879007
Levantamento	-0,79351		
% de variância	30,98466	18,16746	14,29653

Cargas fatoriais superiores a 0,7 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1,0$ .

O Fator 1 foi carregados apenas com o comportamento de levantamento, enquanto o Fator 2 foi carregado com a frequência de *SAP* realizado na superfície e o Fator 3 foi carregado com auto-limpeza na superfície.

Os resultados obtidos a partir da análise fatorial 1 (medidas espaço-temporais) e 2 (medidas complementares) foram então combinados em uma terceira análise fatorial (Tabela 4). Esta análise resultou em quatro fatores distintos que juntos representam 72,09% da variância total. O Fator 1 foi carregado com tempo gasto na toca e na superfície, que apresentaram alta correlação, porém negativa, ademais este fator também foi carregado com auto-limpeza na toca. Fator 2 foi carregado com tempo gasto no túnel e total de entradas, enquanto o Fator 3 foi carregado com frequência de *SAP* no túnel e na superfície que foram alta e positivamente correlacionados entre si, validando o uso desses parâmetros como uma medida única em análises futuras. A latência para atingir a superfície foi carregada sozinha no Fator 4.

**Tabela 4.** Análise fatorial das medidas espaço-temporais e complementares de camundongos socialmente derrotados no teste de reexposição.

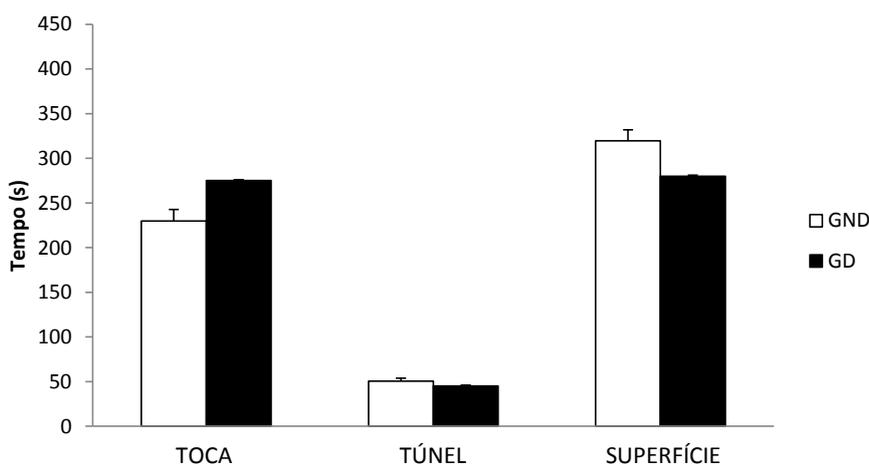
Parâmetro Comportamental	Fatores			
	1	2	3	4
Tempo na toca (s)	0,965			
Tempo no túnel (s)		-0,845		
Tempo na superfície (s)	-0,962			
Total de entradas		-0,757		
SAP na toca				
SAP no túnel			0,735	
SAP na superfície			0,861	
Auto-limpeza na toca (s)	0,806			
Auto-limpeza no túnel (s)				
Auto-limpeza na superfície (s)				
Levantamento				
Latência para atingir a superfície (s)				0,879
% de variância	32,52	15,12	13,40	11,05

Cargas fatoriais superiores a 0,7 são mostradas. Sinais negativos indicam a direção do carregamento particular. Critérios: eigenvalue  $\geq 1$ .

## 4.2. Análise 2: Condicionamento contextual moderado em camundongos

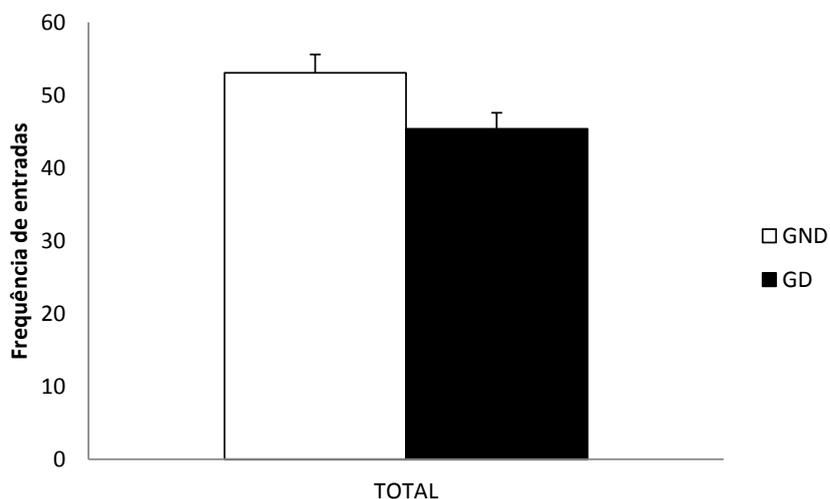
### socialmente derrotados.

O Teste  $t$  de Student não indicou diferenças significativas entre o grupo não derrotado (NDG) e grupo derrotado (GD) quando comparou o tempo médio de permanência na toca ( $t_{(177)} = -2,35$ ;  $P > 0,05$ ), túnel ( $t_{(177)} = 1,07$ ;  $P > 0,05$ ) e na superfície ( $t_{(177)} = 2,23$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 2).



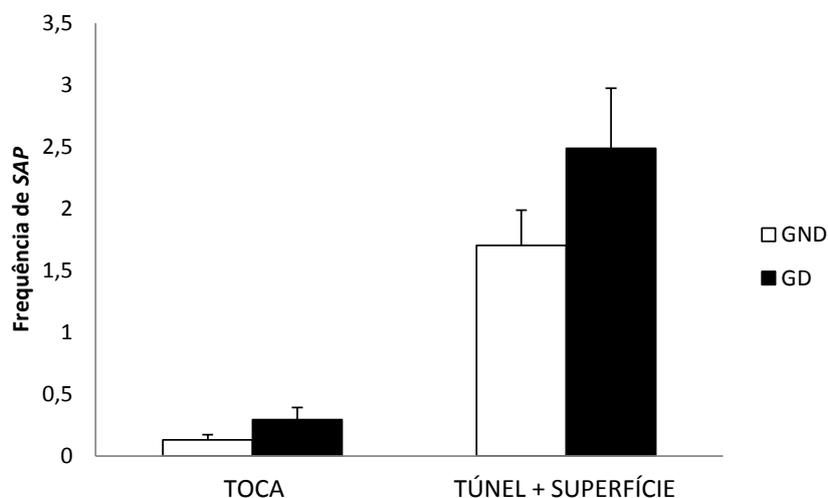
**Figura 2.** Tempo gasto em segundos nos três principais compartimentos do apartamento. As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM ( $n = 89 - 90$ ).

O Teste *t* de Student também não indicou diferenças significativas entre GND e GD quando se comparou a frequência total de entradas (toca, túnel e superfície) ( $t_{(177)} = 1,92, P > 0,05$ ) (Figura 3).

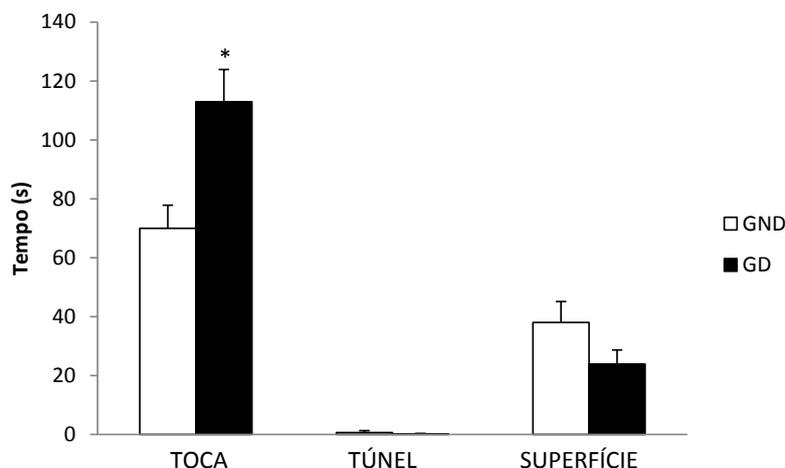


**Figura 3.** Frequência total de entradas nos três compartimentos do aparato (toca, túnel e superfície). As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM ( $n = 89 - 90$ ).

A frequência do comportamento de *SAP* foi muito baixa e não houve diferença entre os grupos tanto para a frequência de *SAP* na toca ( $t_{(177)} = -1,47; P > 0,05$ ) quanto da soma de frequência de *SAP* no túnel e superfície ( $t_{(177)} = 1,32; P > 0,05$ ) (Figura 4).



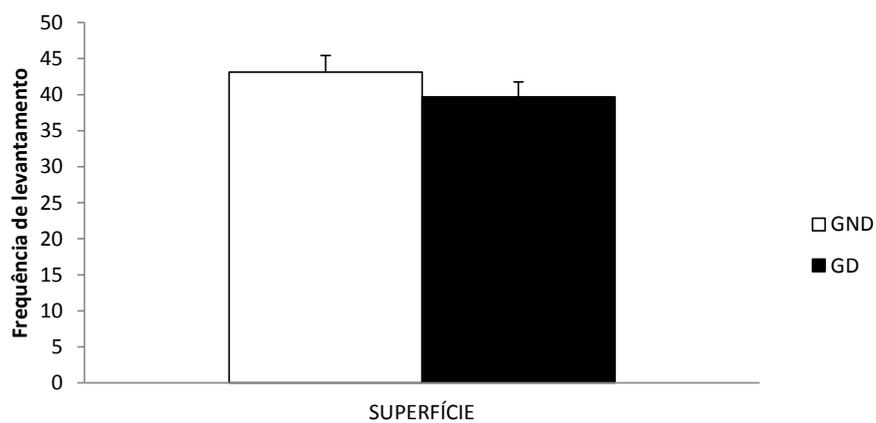
**Figura 4.** Frequência de *SAP* na toca e no túnel + superfície. As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM ( $n = 89 - 90$ ).



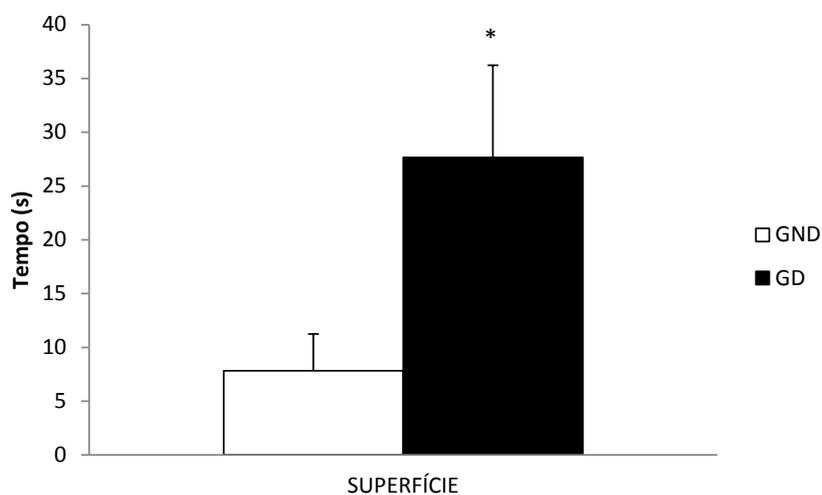
**Figura 5.** Tempo gasto realizando o comportamento de auto-limpeza nos três compartimentos do aparato. As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM (n= 89 - 90). \*P < 0,05 versus GND.

Os indivíduos do GD passaram mais tempo realizando o comportamento de auto-limpeza na toca do que indivíduos do GND ( $t_{(177)} = -3,20$ ;  $P < 0,05$ ). O tempo gasto pelos animais do GD realizando o comportamento de auto-limpeza no túnel e na superfície não diferiu do exibido pelos animais do GND [túnel ( $t_{(177)} = 0,79$ ;  $p > 0,05$ ); superfície ( $t_{(177)} = 1,61$ ;  $P > 0,05$ )] (Figura 5).

Uma única derrota social não foi capaz de alterar a frequência do comportamento de levantamento em camundongos do GD quando comparado ao GND ( $t_{(177)} = 1,11$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 6); enquanto a latência para atingir a superfície foi maior para os camundongos do GD quando comparado ao GND ( $t_{(177)} = -2,17$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 7).



**Figura 6.** Frequência do comportamento de levantamento na superfície do aparato. As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM (n= 89 - 90).



**Figura 7.** Latência em segundos para atingir a superfície do aparato. As barras representam a média dos dados  $\pm$  SEM (n= 89 - 90). \*P < 0,05 versus GND.

## 5. Discussão

A análise fatorial foi empregada neste trabalho com objetivo de descrever e correlacionar o perfil comportamental de camundongos socialmente derrotados quando reexpostos ao aparato vazio onde a interação agressiva ocorreu previamente. Este recurso estatístico tem sido amplamente utilizado em diversos estudos de caracterização de padrões e perfis comportamentais de camundongos e ratos em diferentes paradigmas comportamentais, tais como o labirinto em cruz elevado, labirinto em cruz elevado-aberto e o teste de exposição ao rato (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1994; CAMPOS et al., 2013; KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; RODGERS; JOHNSON, 1995; SORREGOTTI et al., 2013; VAN DE POLL et al., 1982; YOSHIMURA; KIMURA, 1991). Dessa forma, para a análise 1, realizou-se 3 análises fatoriais sucessivas com os dados do perfil comportamental de 90 camundongos socialmente derrotados reexpostos ao contexto onde a interação agressiva ocorreu. Para tanto, a análise fatorial 1 utilizou apenas medidas espaço-temporais, a análise fatorial 2 utilizou medidas complementares e a análise fatorial 3 empregou o resultado das duas análises prévias.

A análise fatorial 1 (estrutura com 2 fatores) validou no fator 1, o uso futuro de uma medida única (entradas totais) para a frequência de entradas na toca, túnel e superfície. Este primeiro fator provavelmente reflete a atividade locomotora dos indivíduos, uma vez que nele foram carregadas as entradas nos três compartimentos do aparato e o tempo gasto no túnel, um ambiente de passagem e ligação das duas principais regiões do aparato: toca e a superfície. O fator 2 desta análise foi carregado com tempo gasto na toca e na superfície, além da latência para atingir a superfície e

possivelmente reflete as medidas de tempo gasto nos principais compartimentos do aparato.

A segunda análise fatorial (estrutura com 3 fatores) apresentou 3 fatores carregados apenas com uma variável cada; o fator 1 foi carregado com comportamento de levantamento e provavelmente reflete a exploração vertical do aparato, enquanto os fatores 2 e 3 foram carregados, respectivamente com frequência de *SAP* e auto-limpeza na superfície. A frequência de *SAP* na superfície do aparato parece refletir comportamentos de avaliação de risco (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; CAMPOS et al., 2013), enquanto uma explicação mais clara do fator 3 (auto-limpeza também na superfície do aparato) ainda precisa ser determinada por meio de outras intervenções, como a farmacológica por exemplo.

A análise fatorial 3 (estrutura com 4 fatores) apresentou 4 fatores, no fator 1 foram carregados o tempo gasto na toca e tempo gasto realizando comportamento de auto-limpeza neste mesmo compartimento. O tempo gasto na superfície do aparato também foi carregado neste fator, porém negativamente. Considerando que o tempo gasto no túnel representa apenas cerca 7,5% do tempo total permanecido no aparato, parece ser razoável sugerir que o tempo gasto na toca é oposto ao tempo gasto na superfície. Ademais, ao permanecer na toca, os indivíduos realizaram o comportamento de auto-limpeza, o que parece refletir o reconhecimento da toca como um local seguro para se apresentar esse tipo de comportamento recuperativo (DOMJAN, 2010; SPRUIJT; MAGNUS, 1992). O fator 2 foi novamente carregado com a frequência total de entradas e o tempo gasto no túnel, reforçando mais uma vez a provável associação deste fator com comportamentos locomotores dos animais. O fator 3 validou o uso futuro do *SAP* no túnel e na superfície como uma medida única (*SAP* túnel +

superfície), enquanto o fator 4 foi carregado apenas com a latência para atingir a superfície do aparato.

A fim de avaliar se uma única derrota social seria capaz de condicionar respostas comportamentais quando os animais fossem reexpostos ao contexto onde a interação social ocorreu previamente, nós compramos o perfil comportamental de 89 camundongos não derrotados ao perfil de 90 camundongos socialmente derrotados. Assim sendo, nós pudemos observar que apenas duas medidas comportamentais foram condicionadas ao contexto onde a interação agressiva ocorreu: latência para atingir a superfície e tempo gasto realizando comportamento de auto-limpeza na toca. Uma vez que os camundongos socialmente derrotados sofreram a interação agressiva na superfície do aparato, estes permaneceram por mais tempo na toca e no túnel antes de adentrar a superfície do aparato onde eles foram socialmente derrotados, sugerindo que os animais associaram a superfície com a interação agressiva. Entretanto, curiosamente na análise fatorial 3, a latência para atingir a superfície não foi carregada no fator 1 onde o tempo gasto na toca correlacionou-se intensamente.

Indivíduos socialmente derrotados passaram mais tempo realizando comportamento de auto-limpeza na toca do que indivíduos não derrotados. Embora este comportamento apresente como função primária o cuidado e proteção da superfície externa corpórea, sua ocorrência pode ser modulada por fatores emocionais (ESTANISLAU et al., 2013). Sabe-se que os substratos neurais que coordenam comportamentos direcionados aos cuidados da superfície corpórea apresentam circuitos em comum com substratos neurais envolvidos com processamento de estímulos estressores (SPRUIJT; MAGNUS, 1992). A auto-limpeza é um comportamento importante do repertório comportamental de roedores e apresenta uma projeção hierarquicamente determinada (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000), geralmente seguindo

uma direção cefalo-caudal: lambe as patas dianteiras – limpeza do focinho e face – limpeza da cabeça – limpeza do corpo – lambe a pelagem – lambe as patas posteriores – lambe/limpeza da cauda e genitais (BLANCHARD et al., 1990; EDMUNDS, 1974). Além disso, trata-se de um comportamento altamente coordenado por sistemas motores encefálicos a fim de garantir que cada ação componente do comportamento ocorra na sequência adequada para que o comportamento seja de fato efetivo (BERRIDGE; WHISHAW, 1992). O comportamento de auto-limpeza pode ocorrer em diversos contextos e geralmente está aumentado em duas situações opostas: níveis elevados e baixos de estresse (KALUEFF; TUOHIMAA, 2004). Kalueff & Tuohimaa (2005) mostraram em camundongos que uma droga ansiolítica (diazepam – 0,1 mg/kg e 0,5 mg/kg) não alterou o número e a duração de episódios de auto-limpeza, mas reduziu a porcentagem de transições incorretas e de episódios quando comparado a animais não tratados com a droga. Por outro lado, o tratamento de camundongos com pentilenotetrazol (5 mg/kg e 10mg/kg), uma droga ansiogênica (JUNG; LAL; GATCH, 2002), aumentou a duração dos episódios de auto-limpeza, a porcentagem de transições incorretas e a porcentagem de episódios interrompidos. Nossos dados são consistentes com resultados prévios que demonstraram que ratos socialmente derrotados passaram mais tempo realizando comportamento de auto-limpeza de 25-30 minutos após a interação agressiva com um co-específico ter ocorrido quando comparado a ratos não derrotados (VAN ERP et al., 1994).

Estudos apontam a associação de ondas lentas de eletroencefalograma no córtex cingulado de ratos com a expressão do comportamento de auto-limpeza (LEUNG; BORST, 1987), além disso, não existem correlações que afirmem associação direta entre a auto-limpeza e indicadores clássicos de estados ansiogênicos tais como micção e defecação aumentadas e *freezing* (FILE; MABBUTT; WALKER, 1988; FILE, 1980).

Aparentemente, em roedores, a expressão do comportamento de auto-limpeza está mais associada ao período após o pico de exposição à fonte estressora do que com o período de medo/ansiedade elevada. Assim sendo, é mais provável que a expressão da auto-limpeza reflita o processo de redução do *arousal* devido ao término da exposição à fonte estressora ou habituação a situação aversiva. Considerando que segundo o nosso protocolo, os animais socialmente derrotados aumentaram o tempo realizando auto-limpeza na toca (área protegida) quando reexpostos ao aparato vazio 24hrs após a interação agressiva ter ocorrido, parece ser sensato sugerir que este parâmetro comportamental esteja mais associado à redução do *arousal*.

Embora os animais tenham sido socialmente derrotados exclusivamente na superfície do aparato, eles não apresentaram aversão espacial à superfície. Resultados similares foram obtidos por Faturi et.al (2014), que demonstraram que ratos socialmente derrotados apresentaram diferentes preferências espaciais quando reexpostos (24hrs após) ao aparato onde a interação agressiva ocorreu. Animais derrotados reexpostos ao aparato com maravalha do agressor (contendo o odor do rato agressor) apresentaram aversão pelo compartimento onde a interação agressiva ocorreu, enquanto ratos derrotados reexpostos ao aparato com maravalha limpa (sem odor do rato agressor) não apresentaram aversão espacial. Estes resultados em conjunto sugerem que o uso de mais pistas ambientais, como por exemplo, o odor do co-específico agressor, pode ser necessário para gerar condicionamento contextual mais robusto quando uma única derrota social é empregada.

Faz-se importante destacar que o total de entradas nos três compartimentos do aparato, bem como a frequência do comportamento de levantamento não diferiram entre os camundongos do GND e de GD, sugerindo que uma única derrota social não foi capaz de alterar ou comprometer a atividade locomotora e de exploração (total e

vertical) dos animais. Esses resultados corroboram os dados recentes de Faturi et al., (2014). Em relação ao comportamento de *SAP*, não se observou diferença na frequência deste entre GND e GD. Porém, é importante destacar que a frequência desse comportamento foi muito baixa para os dois grupos. Resultados similares foram mostrados por Faturi et al. (2014), utilizando ratos como sujeitos experimentais.

Alguns pontos críticos do nosso estudo devem ser considerados, tais como as diferenças individuais presentes entre os animais. Tais particularidades podem representar estratégias distintas de enfrentamento do estresse social (alguns animais necessitam de interações agressivas intensas para se reconhecerem socialmente derrotados, enquanto outros animais realizam postura de submissão havendo apenas contato visual com o co-específico agressor), as quais podem interferir no perfil comportamental desses animais quando reexpostos ao aparato. Outro ponto que merece destaque é o uso de uma única derrota social; camundongos são animais sociais que vivem em colônias com hierarquias sociais bem estabelecidas, sabe-se que interações agressivas entre co-específicos são muito frequentes na colônia, dessa forma é possível que uma única interação agressiva não seja estressante o suficiente para gerar respostas de condicionamento ao contexto. Algumas alternativas possíveis para fortalecer o condicionamento ao contexto em camundongos socialmente derrotados seria o uso de pistas ambientais adicionais durante a fase de interação social e de reexposição dos animais ao aparato, assim como utilizado por Faturi et al. (2014), e/ou aumentar a intensidade do estresse social.

Em conclusão, por meio do recurso estatístico de análise estatística, o presente estudo traçou o perfil comportamental de camundongos socialmente derrotados em um novo paradigma envolvendo derrota social. Este trabalho também mostrou que uma única derrota social foi capaz de condicionar os seguintes parâmetros comportamentais:

latência para atingir a superfície do aparato e auto-limpeza na toca, sem comprometer a atividade locomotora e comportamento de exploração dos animais. Entretanto, uma única derrota social não foi capaz de gerar condicionamento ao contexto de medidas clássicas, tais como aversão espacial (em relação à superfície onde a interação agressiva ocorreu) e medidas de avaliação de risco, como a frequência de *SAP*. Além disso, o uso de uma fonte estressora única e aguda na ausência de qualquer tipo de pista ambiental no teste de reexposição dos animais podem ter contribuído para o baixo índice de respostas defensivas exibidas pelos camundongos socialmente derrotados. Alternativas para tornar o protocolo proposto e utilizado neste trabalho mais robusto para gerar condicionamento ao contexto poderiam ser (a) agrupar os animais em grupos mais ou menos responsivos ao estresse de derrota social; (b) aumentar o número de interações agressivas e/ou (c) adicionar mais pistas ambientais para facilitar o aprendizado contextual.

## 6. Referências Bibliográficas

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. **Behavioural Brain Research**, v. 62, n. 2, p. 187–193, jun. 1994.

ALMEIDA-FILHO, N. et al. Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo e Porto Alegre). **Revista ABP-APAL**, v. 14, n. 3, p. 93–104, 26 abr. 1992.

ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric estimates. **Br J Psychiatry**, v. 171, p. 524–529, 1997.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorder V**. Washington D C: APA, 2013. v. 209

ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 25, n. 6, p. 286–290, abr. 1998.

BECK, A. T. **Cognitive therapy of emotional disorders**. New York: American Library, 1976. v. 43

BEDEN, S. N.; BRAIN, P. F. Studies on the effect of social stress on measures of disease resistance in laboratory mice. **Aggressive Behavior**, v. 8, n. 2, p. 126–129, 1982.

BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-Stereotypy I: Enhancement of a Complex Movement Sequence by Systemic Dopamine D1 Antagonists. **Synapse**, v. 37, p. 194–204, 2000.

BERRIDGE, K. C.; WHISHAW, I. Q. Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. **Experimental Brain Research**, v. 90, p. 275–290, 1992.

BERTON, O. et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5762, p. 864–8, 10 fev. 2006.

BLANCHARD, D. C. et al. Visible burrow system as a model of chronic social stress: Behavioral and neuroendocrine correlates. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 117–134, 1995.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 97–116, fev. 2003.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. In: OLIVIER, B.; MOS, J.; SLAGEN, J. L. (Eds.). . **Animals models in Psychopharmacology**. Basel: Birkhauser, 1991. v. 969p. 117–134.

BLANCHARD, R. J. et al. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 463–472, dez. 1990.

- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3–14, jan. 1989.
- BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. O. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 2, p. 225–232, out. 2000.
- BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 1 maio 2010.
- CAMPOS, K. F. C. et al. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behavioural brain research**, v. 240, p. 160–70, 1 mar. 2013.
- CLARK, R. E. Anxiety states: panic and generalized anxiety. In: HAWTON, K. et al. (Eds.). . **Cognitive Behaviour therapy for psychiatric problems: a practical guide**. Oxford: Oxford Medical Publications, 1989. v. 101p. 52–96.
- DARWIN, C. R. **The expression of the emotions in man and animals**. London: John Murray, 1872. v. 55
- DAVIS, M. The Role Of The Amygdala In Fear And Anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 353–375, 1 jan. 1992.
- DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305–15, jan. 1991.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R. J. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. v. 14
- DOMJAN, M. **The principle of learning and behavior: active learning**. 6th. ed. Austin: Wadsworth Publishing Company, 2010. v. 11
- EDMUNDS, M. **Defence in animals**. Harlow: Lognman, 1974. v. 27
- ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. **Neuroscience research**, v. 77, n. 4, p. 187–201, dez. 2013.
- FATURI, C. B. et al. Functional mapping of the circuits involved in the expression of contextual fear responses in socially defeated animals. **Brain structure & function**, v. 219, n. 3, p. 931–46, maio 2014.
- FEDOROFF, I. C.; TAYLOR, S. Psychological and pharmacological treatments of social phobia: a meta-analysis. **J Clin Psychopharmacol**, v. 21, p. 311–324, 2001.

- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; DA SILVA JÚNIOR, J. A. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opinião Pública**, v. 16, n. 1, p. 160–185, 2010.
- FILE, S. E. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordizepoxide-like drugs. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 2, p. 219–238, 1980.
- FILE, S. E. Behavioural detections of anxiolytic action. In: ELLIOT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (Eds.). . **Experimental Approaches to anxiety and depression**. Chichester: Wiley, 1992. p. 24–44.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can Social Interaction Be Used To Measure Anxiety? **British Journal of Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 19–24, 19 jan. 1978.
- FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; WALKER, J. H. Comparison of Adaptive Responses in Familiar and Novel Environments: Modulatory Factors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, n. 1, p. 69–79, maio 1988.
- FLESHNER, M. et al. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. **Physiology & Behavior**, v. 45, n. 6, p. 1183–1187, jun. 1989.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Revista Brasileira de pesquisa médica e biomédica**, v. 27, n. 4, p. 811–829, 1994.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. Segunda ed. São Paulo: Atheneu, 2012. v. 290
- GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 105
- GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. Second ed. New York: Oxford University Press, 2003.
- GREEN, S.; HODGES, H. Animal models of anxiety. In: WILLNER, P. (Ed.). . **Behavioural models in Psychopharmacology**. Cambridge: CUP, 1991. v. 927p. 21–49.
- GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmac. Ther**, v. 65, n. 94, p. 319–395, 1995.
- HANDLEY, S. L. Serotonin in animals models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: IDZIKAWSKI, C.; COWEN, P. (Eds.). . **Serotonin, sleep and mental disorder**. Petersfield: Wrightson Biomedical, 1991. v. 7p. 89–115.
- HARDY, C.-A. et al. Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 6, p. 1245–1251, jun. 1990.

- HERBERT, J. Neuroendocrine responses to social stress. In: GROSSMAN, A. (Ed.). . **Neuroendocrinology of Stress (Bailliere's Clinical Endocrinology & Metabolism)**. Londres: Baillière Tindall., 1987. v. 1p. 467–490.
- HUHMANN, K. L. et al. Effects of Social Conflict on POMC-Derived Peptides and Glucocorticoids in Male Golden Hamsters. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 49, p. 949–956, 1990.
- JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 429–439, jun. 2002.
- KALUEFF, A. V; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain research. Brain research protocols**, v. 13, n. 3, p. 151–8, ago. 2004.
- KALUEFF, A. V; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European journal of pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 147–53, 31 jan. 2005.
- KESSLER, R. C. et al. Lifetime and 12-Month prevalence of DSM-III-R Psychiatric disorders in the United States. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, p. 8–19, 1994.
- KIDMAN, A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 32, p. 391–402, 1989.
- KUDRYAVTSEVA, N. N.; BAKSHTANOVSKAYA, I. V; KORYAKINA, L. A. Social Model of Depression in Mice of C57BL / 6J Strain. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 38, p. 315–320, 1991.
- LACERDA, G. F. M. L. Ansiedade em modelos animais: efeitos de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 98, p. 63, jan. 2006.
- LEDOUX, J. E. Emotion: clues from the brain. **Annu Rev Psychol**, v. 46, p. 209–235, 1995.
- LEPINE, J. P. The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and social costs. **Journal of Clinic Psychiatry**, v. 63, n. 17, p. 4–8, 2002.
- LEUNG, L.-W. S.; BORST, J. G. G. Electrical activity of the cingulate cortex. I. Generating mechanisms and relations to behavior. **Brain Research**, v. 407, n. 1, p. 68–80, mar. 1987.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, jan. 1990.
- LUKAS, M. et al. The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. **Neuropsychopharmacology : official**

**publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 11, p. 2159–68, out. 2011.

MARTINEZ, M.; PHILLIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. February 1997, p. 20–33, 1998.

MICZEK, K. A. Ethological analysis of drug action on aggression and defense. **Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.**, v. 7, p. 519–524, 1983.

MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL. Anuário Estatístico da Previdência Social. In: **Ministério da Previdência Social**. Brasília: Ministério da Previdência Social, 2011. p. 889.

NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 2, p. 233–266, jan. 1990.

RAAB, A. et al. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. **Physiology & Behavior**, v. 36, n. 2, p. 223–228, jan. 1986.

RAJ, B. A.; SHEEHAN, D. V. Social Anxiety Disorder. **Medical Clinics of North America**, v. 85, n. 3, p. 711–733, maio 2001.

RATNER, S. C. Comparative aspects of hypnosis. In: GORDON, J. E. (Ed.). . **Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis**. New York: Collier Macmillan Ltd, 1967. p. 550–587.

RODGERS, R. J. Neuropharmacological aspects of adaptive pain inhibition in murine “victims” of aggression. **Aggressive Behavior**, v. 21, n. 1, p. 29–39, 1995.

RODGERS, R. J. et al. Ethopharmacological analysis of the effects of putative “anxiogenic” agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 52, n. 4, p. 805–13, dez. 1995.

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 3, p. 289–304, mar. 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety Enhancement in the Murine Elevated Plus Maze by Immediate Prior Exposure to Social Stressors. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 49, p. 383–388, 1993.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–10, nov. 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297–303, out. 1995.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. Psychopharmacology Benzodiazepine ligands , nociception and ' defeat ' analgesia in male mice. **Psychopharmacology**, v. 91, p. 305–315, 1987.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Acute non-opioid analgesia in Defeated Male Mice. **Physiology & Behavior**, v. 36, p. 947–950, 1986a.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Resident's scent: A critical factor in acute analgesic reaction to defeat experience in male mice. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. 2, p. 317–322, jan. 1986b.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Blockade of non-opioid analgesia in intruder mice by selective neuronal and non-neuronal benzodiazepine recognition site ligands. **Psychopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 45–54, set. 1988.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Prevention of the analgesic consequences of social defeat in male mice by 5-HT<sub>1A</sub> anxiolytics, buspirone, gepirone and ipsapirone. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 374–380, nov. 1989.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Attenuation of defensive analgesia in male mice by 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ICS 205-930, MDL 72222, MDL 7314EF and MDL 72699. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 6, p. 553–560, 1992.

SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. (Eds.). . **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 105p. 265–283.

SORREGOTTI, T. et al. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behavioural brain research**, v. 246, p. 76–85, 1 jun. 2013.

SPRUIJT, B. M.; MAGNUS, R. Ethology and Neurobiology of Grooming Behavior. **Psychological Reviews**, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.

STEPHENS, D. N.; ANDREWS, J. S. Screening for anxiolytic drugs. In: WILLNER, P. (Ed.). . **Behavioural models in Psychopharmacology**. Cambridge: CUP, 1991. p. 50–75.

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. The anxiogenic video-recorded Stroop Color-Word Test: psychological and physiological alterations and effects of diazepam. **Physiology & behavior**, v. 82, n. 2-3, p. 215–30, 15 set. 2004.

TORNATZKY, W.; MICZEK, K. A. Long-Term Impairment of Autonomic Circadian Rhythms After Brief Intermittent Social Stress. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 39, p. 983–993, 1993.

TOTH, I.; NEUMANN, I. D. Animal models of social avoidance and social fear. **Cell and tissue research**, 13 jun. 2013.

TREIT, D. Animal models of anxiety and anxiolytic drug action. In: DER BOER, J. A.; SETSEN, J. M. A. (Eds.). . **Handbook of depression and anxiety**. New York: Marcel Dekker, 1994. v. 38p. 201–224.

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

VAN DE POLL, N. E. et al. Aggressive behaviour in rats: effects of winning or losing on subsequent aggressive interactions. **Behavioural Process**, v. 7, p. 143–155, 1982.

VAN ERP, A. M. M. et al. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. **Behavioural Brain Research**, v. 65, p. 47–55, 1994.

VAN VLIET, I. M.; DEN BOER, J. A.; WESTENBERG, H. G. M. Psychopharmacological treatment of social phobia; a double blind placebo controlled study with fluvoxamine. **Psychopharmacology**, v. 115, n. 1-2, p. 128–134, jun. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 Classification of mental and behavioural disorders: diagnostic criteria for research**. Geneva: World Health Organization, 1982. v. 1960

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 3, p. 465–73, maio 2004.

YOSHIMURA, H.; KIMURA, N. Ethopharmacology of copulatory disorder induced by chronic social conflict in male mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 4, p. 497–500, dez. 1991.

ZANGROSSI, H. J.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. In: GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. (Eds.). . **Transtornos de Ansiedade**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 37p. 55–73.