



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**PROVOCAÇÃO SOCIAL E AGRESSIVIDADE MATERNAL EM RATAS NO
PERÍODO PÓS-PARTO: PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B} NO
NÚCLEO DORSAL DA RAFA E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, HORMÔNIOS DO
ESTRESSE E IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS**

CAROLINE PERINAZZO DA VEIGA

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**PROVOCAÇÃO SOCIAL E AGRESSIVIDADE MATERNAL EM RATAS NO
PERÍODO PÓS-PARTO: PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B} NO
NÚCLEO DORSAL DA RAPE E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, HORMÔNIOS DO
ESTRESSE E IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS**

CAROLINE PERINAZZO DA VEIGA

**Orientadora
Profa. Dra. Rosa Maria Martins de Almeida**

**Co-orientador
Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial do título de doutor em
Neurociências

Porto Alegre
2011

Ao meu Amor - Alessandro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com carinho à minha orientadora, professora Dra. Rosa Almeida, por ter proporcionado a continuidade dos meus estudos na sua linha de pesquisa. Pelos conhecimentos transmitidos de forma simples e prática, pela amizade, pela confiança no meu trabalho e pelo incentivo para que eu atingisse meus objetivos.

Ao professor Dr. Aldo Bolten Lucion, um exemplo de pesquisador a ser seguido. Obrigada pela oportunidade de ingressar e permanecer no seu laboratório, pela amizade e por ter sempre algo novo a ensinar.

Às alunas de iniciação científica da Unisinos: Graciela, Fernanda e Verônica, pela ajuda nas mais diferentes tarefas. Vocês contribuíram muito para o andamento dos experimentos. Muito obrigada também pelo vínculo de amizade que foi possível se formar.

À Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, por ter aberto suas portas para a realização de grande parte dos meus experimentos.

Ao Dirson, um colega muito querido, sempre disposto a ajudar. Obrigada por tudo: desde sua sincera amizade até o “socorro” nos momentos mais complicados dos experimentos.

Aos colegas da pós e do laboratório da UFRGS. Em especial ao Adolfo, Anelise, Cármen, Bruno, Helena, Felipe, Marcinha, Simone, Vanise e Marcelo. Alguns já concluíram seus estudos, mas fica a lembrança. Obrigada pelos momentos de descontração, pela ajuda nos experimentos e por terem contribuído na minha formação.

À Dona Geni, que foi sempre muito solícita e contribuiu para o andamento dos experimentos, fornecendo os animais.

Ao professor Marcelo Grilo pelo auxílio nas pesagens dos fármacos e pelas palavras amigas, que me deram força nos momentos difíceis.

Ao professor Celso Rodrigues Franci, pelas dosagens hormonais.

À Eloisa Pavesi e professora Elisa Winkelmann-Duarte, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo auxílio na técnica da imunistoquímica e por terem se tornado amigas muito especiais.

À minha mãe Maria, meu pai Francisco, minha irmã Cassiana e meu cunhado Everaldo. Vocês foram a base para que hoje eu me tornasse esta pessoa. Muito obrigada pelo incentivo, confiança e pelo amor, que, apesar da distância, nunca me faltou!

Ao Alessandro. Obrigada por ser esta pessoa maravilhosa que Deus colocou em minha vida. Pela incansável ajuda em todos os momentos, me ensinando a “mexer” com os programas, me ouvindo, aconselhando e estando ao meu lado em todas as horas. Você soube compreender os momentos de ausência. Obrigada Meu Querido!

À Rita, Ademir, Nicole e Dennizard. Obrigada pelo carinho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, por tudo o que aprendi nesta jornada.

Ao Dr. Klaus Miczek pelas sugestões para a realização dos experimentos, pelo fornecimento dos fármacos e pela incansável orientação na submissão dos artigos.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e à CAPES pela bolsa de estudos concedida neste período.

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
CAPÍTULO I	1
PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B}	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Comportamento Agressivo	2
1.2 Comportamento Agressivo Maternal	4
1.3 Circuitos Neurais da Agressividade	7
1.4 Córtex Pré-Frontal	10
1.5 Núcleo Dorsal da Rafe Mesencefálica	13
1.6 Serotonina	15
1.6.1 Receptores 5-HT _{1A}	21
1.6.2 Receptores 5-HT _{1B}	22
1.7 Aumento do Comportamento Agressivo	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
ARTIGO 1	62
SOCIAL INSTIGATION E AGGRESSION IN POSTPARTUM FEMALE RATS: ROLE OF 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B} RECEPTORS IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS AND PREFRONTAL CORTEX	62

CARTA DE ACEITE DO ARTIGO.....	63
CAPÍTULO II	64
PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E RESPOSTA HORMONAL DE RATAS LACTANTES E MACHOS ADULTOS WISTAR.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	65
1.1 Comportamento Agressivo de Ratos Machos	65
1.2 Período Pós-Parto.....	67
1.3 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal	68
2. OBJETIVOS	76
2.1 Objetivo Geral	76
2.2 Objetivos Específicos.....	76
ARTIGO 2.....	78
EFFECT OF SOCIAL INSTIGATION AND OF AGGRESSIVE BEHAVIOR ON THE HORMONAL RESPONSE OF LACTATING DAMS AND ADULT MALE WISTAR RATS.....	78
CAPÍTULO III	118
PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS EM RATAS LACTANTES WISTAR.....	118
1. INTRODUÇÃO.....	119
1.1 Proteína Fos	119
1.2 C-fos e Comportamento Agressivo.....	124
2. OBJETIVOS	126
2.1 Objetivo Geral	126
2.2 Objetivos Específicos.....	126
ARTIGO 3.....	128
EXPRESSÃO DE C-FOS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NÚCLEO DORSAL DA RAPE MESENFÁLICA EM RATAS LACTANTES SUMETIDAS À PROVOCAÇÃO SOCIAL.....	128

DISCUSSÃO	154
CONCLUSÕES	166
PERSPECTIVAS	169
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em capítulos. Os três primeiros capítulos estão divididos nos seguintes tópicos: *Introdução*, *Objetivos* e o *Artigo Científico* referente ao capítulo.

A *Introdução* apresenta o referencial teórico, a partir do qual o objetivo de cada capítulo da tese foi proposto. O *Objetivo Geral* e os *Objetivos Específicos* também estão dispostos nos capítulos, de acordo com o tema abordado. Os *Artigos Científicos* compõem a sessão final de cada capítulo, organizados com o intuito de responder aos objetivos propostos de cada capítulo.

Na *Discussão* os resultados desta tese são analisados.

A seguir, as *Conclusões* obtidas a partir da realização dos experimentos são abordadas e as *Perspectivas* descrevem futuros trabalhos que possivelmente possam ser realizados.

Por fim, as *Referências Bibliográficas* listam os trabalhos citados na *Introdução* dos três capítulos e na *Discussão* da tese.

LISTA DE FIGURAS***Capítulo I***

Figura 1 - Esquema representativo resumindo os efeitos das lesões em áreas encefálicas sobre a agressão maternal em roedores. (Reproduzido de Lonstein e Gammie, 2002). 9

Figura 2 - Córtex pré-frontal. (Reproduzido de De Almeida et al., 2008). 111

Figura 3 - Esquema representativo de um neurônio serotoninérgico. (Reproduzido de Olivier e Oorschot, 2005).. 20

Figura 4 - Provocação Social 28

Capítulo II

Figura 1 - Representação esquemática do eixo HPA. (Adaptado de Tilbrook e Clarke, 2006). 70

Figura 2 - Mecanismos de redução na atividade do eixo HPA induzido pelo estresse no final da prenhez e na lactação, em ratos. Destaque em azul para a lactação. 72

Capítulo III

Figura 1 - Esquema representando a região regulatória do gene c-fos (Reproduzido de Kovács, 1998)..... 121

LISTA DE TABELAS*Capítulo II*

Tabela 1 - Exemplos de alterações neuroendócrinas e comportamentais observadas na prenhez e lactação (Reproduzido de Slattery e Neumann, 2008)	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHA - hipotálamo anterior
- BA - área de Brodmann
- BNST - núcleo da estria terminal
- CSF - líquido cerebrospinal
- DLPFC - córtex pré-frontal dorsolateral
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- DRN - núcleo dorsal da rafe
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- Kg - quilograma
- IEGs - genes precoces imediatos
- LAS - septo lateral
- MAO – monoaminoxidase
- MeA - amígdala medial
- MPOA - área pré-óptica medial
- 8-OH-DPAT - 8-hidroxi-2-di-N-propilaminotetralina
- PAG – substância cinzenta periaquedutal
- PCPA - p-cloro-fenilamina
- PET- tomografia por emissão de pósitrons
- PFC - córtex pré-frontal
- pKi - coeficiente de afinidade

PPN - núcleo peripeduncular do mesencéfalo lateral

PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo

RNA - Ácido ribonucléico

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SSRIs - inibidores seletivos de recaptção da serotonina

TFMPP - 3-Trifluoromethylphenylpiperazine

VMH - hipotálamo ventromedial

VO PFC – região ventro-orbital do córtex pré-frontal

VTA - área tegmental ventral

5-HT ou 5-hidroxitriptamina - serotonina

5-HTP - 5-hidroxi-triptofano

5-HTT - transportador da serotonina

5-HIAA - Ácido 5-Hidroxi-3-Indol Acético

RESUMO

O objetivo desta tese foi estudar o comportamento agressivo de ratas Wistar no período pós-parto. Para isto, foram avaliados os efeitos anti-agressivos dos agonistas dos receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) e 5-HT_{1B} (CP-93,129), microinjetados no núcleo dorsal da rafe (DRN) e na região ventro-orbital do córtex pré-frontal (VO PFC), respectivamente. O comportamento agressivo foi analisado, utilizando o protocolo da provocação social e as respostas neuroendócrinas bem como a ativação neuronal nas mesmas regiões citadas acima, através da expressão de *c-Fos*, também foram estudadas.

Nossos resultados mostraram que o 8-OH-DPAT aumentou o comportamento agressivo das fêmeas no período pós-parto, atuando nos autorreceptores somatodendríticos do DRN, enquanto a ativação dos receptores 5-HT_{1B} na VO PFC, através do CP-93,129 apresentou efeitos anti-agressivos evidenciados pela diminuição da frequência e duração dos comportamentos agressivos de ataque lateral e mordidas no corpo do intruso.

Após a submissão das ratas lactantes à provocação social ou ao confronto agressivo, na presença dos seus filhotes, ocorreu uma redução nos níveis plasmáticos de corticosterona e esta resposta também prevaleceu quando ocitocina, prolactina e progesterona foram dosados.

Quanto à análise da técnica de imunistoquímica para a proteína Fos, nossos resultados mostraram que ratas lactantes, submetidas à provocação social e comportamento agressivo, contra um macho intruso, na presença dos filhotes, aumentam a expressão da imunorreatividade à proteína Fos especificamente na região VO do PFC. Por outro lado, não houve alteração na expressão de Fos no DRN após exposição à provocação social ou teste de agressividade.

Concluimos que o CP-93,129 quando microinjetado na região VO PFC de ratas provocadas socialmente, no período pós-parto, reduziu o comportamento agressivo maternal, atuando ou nos autorreceptores pré-sinápticos terminais ou nos heterorreceptores pós-sinápticos e que a microinjeção de 8-OH-DPAT no DRN, aumentou o comportamento agressivo de ratas lactantes, através da ativação dos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} . Ratas provocadas e com comportamento agressivo aumentam a expressão de c-Fos no VO PFC, complementando resultados prévios com microinjeção de agonistas 5-HT_{1B} nesta mesma região. Finalmente, a provocação social e o confronto agressivo causaram uma redução significativa dos níveis hormonais em ratas lactantes, mostrando, desta maneira, que a lactação é um fator relevante na caracterização das respostas neuroendócrinas ao estresse. Estes resultados adicionam conhecimento acerca da modulação do comportamento agressivo em ratas Wistar e do protocolo da provocação social como uma ferramenta para estudos em modelos animais de agressividade escalada.

CAPÍTULO I

PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B}

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento Agressivo

A agressividade, em termos gerais, pode ser considerada como um comportamento que implica em danos, ferimentos ou somente em ameaças ao indivíduo (Berkowitz, 1983). Quando apresentado de maneira apropriada, o comportamento agressivo serve como uma importante função biológica na fixação de recursos para o sucesso reprodutivo e transmissão dos genes (Sih *et al.*, 2004).

Análises neurobiológicas e comportamentais da agressão em várias espécies contribuem para a compreensão da violência humana e o desenvolvimento de intervenções terapêuticas (Miczek, 2001) que possam reduzir o comportamento agressivo patológico ou maladaptativo (Nelson e Trainor, 2007). Surto de agressão que resultam em prejuízos e danos são problemas de grande impacto social para a saúde pública e para os sistemas de justiça criminal e este problema é ainda mais agravado devido ao fato de que não há opções de tratamento adequado até o presente momento (Volavka, 1995; De Almeida *et al.*, 2005 a).

Nos seres humanos, níveis elevados de agressividade são sinônimos de violência, sendo reconhecidos com uma condição patológica que requer tratamento e prevenção (Krug *et al.*, 2002; Moffitt *et al.*, 2008).

A agressividade também está associada com diversas desordens psiquiátricas, incluindo autismo, esquizofrenia, desordens afetivas e comportamento suicida (Riley *et al.*, 1989; Fava, 1997; Swann, 1999; Joiner *et al.*, 2005; Kovacsics *et al.*, 2009; Kovacsics e Gould, 2010).

Sob a perspectiva biológica, a agressividade é importante para a sobrevivência do indivíduo (Miczek, 2001), sendo necessária para obtenção ou defesa de comida pelos machos competidores, e analisado de acordo com uma perspectiva psiquiátrica, é motivado por construção hipotética como raiva, irritação, frustração, medo e algumas vezes prazer (Blair *et al.*, 2006).

Comportamento agressivo é um comportamento instintivo e essencial em muitas espécies de mamíferos e pode ser classificada em duas categorias: 1) agressividade afetiva e 2) agressividade predatória (Moyer, 1968). A agressividade afetiva pode ser dividida em: *a*) agressividade ofensiva e *b*) agressividade defensiva. A amígdala medial, o núcleo da estria terminal, o hipotálamo (ventrolateral e dorsolateral) e parte da substância cinzenta periaquedutal são áreas que estão interconectadas com o hipotálamo anterior e estão relacionadas com o comportamento ofensivo (Delville *et al.*, 2000).

Agressividade defensiva é tipicamente ativada por ataques de um predador ou experimentador (Blanchard e Blanchard, 1984; Albert *et al.*, 1993) e pode ser potencializada pelo medo ou dor sendo independente da testosterona (Blanchard e Blanchard, 1984; Albert *et al.*, 1993). Em gatos, a agressividade defensiva envolve uma circuitária neural que é composta pelo hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal (Gregg e Siegel, 2001). Em ratos, o comportamento de ataque pode ser deflagrado através de estimulação elétrica da área hipotalâmica intermédia e parte ventrolateral do núcleo hipotalâmico ventromedial – área de ataque (ver Kruk, M.R., 1991, para revisão).

De acordo com Barratt (1994), a impulsividade é um conceito multidimensional que engloba falha na inibição da resposta, o processamento rápido da informação, busca por novidades e inabilidade em tolerar o atraso de um reforço. A impulsividade também caracteriza alguns distúrbios psiquiátricos, como em particular desordens de personalidade “borderline” e antisocial (Stein *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 2003). O termo impulsividade é

usualmente utilizado quando se refere a comportamentos maladaptativos (Daruna e Barnes, 1993; Evenden, 1999). O universo comportamental que reflete impulsividade inclui ações que parecem mal concebidas, expressas prematuramente, excessivamente arriscadas ou inapropriadas e que frequentemente resultam em consequências indesejáveis (Daruna e Barnes, 1993; Evenden, 1999). Assim, a perda do controle da impulsividade está relacionada com suicídio, comportamento agressivo e violência (Plutchik e Van Praag, 1989, 1995; Horn *et al.*, 2003).

1.2 Comportamento Agressivo Maternal

A agressão maternal é um comportamento apresentado pelas mães durante a lactação para proteger os filhotes e para defender seu território na presença de algum intruso (Erskine *et al.*, 1978; Rosenblatt *et al.*, 1994; Lonstein e Gammie, 2002; Numan e Insel, 2003; Lonstein, 2005; Consiglio e Bridges 2009). Ratas lactantes com filhotes atacam intensamente intrusos que invadem seu território, enquanto fêmeas não lactantes raramente demonstram comportamento agressivo (Numan, 1988; Rosenblatt *et al.*, 1988).

Em ratos, o comportamento agressivo maternal ocorre com mais frequência do 3º ao 12º dia pós-parto (Erskine *et al.*, 1978; Consiglio e Bridges 2009). Nessa situação, as fêmeas, além dos parâmetros normalmente observados em machos (investigação social, avançar, dominar, rodear, postura agressiva, ataque lateral, morder), também apresentam o comportamento de ataque frontal e cuidado materno (Lucion e De Almeida, 1996).

Há duas origens importantes das entradas sensoriais que podem regular a agressividade maternal em ratos; aquelas que provêm dos filhotes e as que provêm do intruso (Lonstein e Gammie, 2002). Os filhotes não precisam estar presentes durante o conflito agressivo para as mães apresentarem altos níveis de comportamento agressivo (Flannelly e

Kemble, 1988), mas é necessário que as mães tenham sido recentemente expostas aos filhotes para manterem seus altos níveis de agressividade (Lonstein e Gammie, 2002).

Em adição aos filhotes e aos intrusos, há outros estímulos sensoriais que podem modular a agressividade em ratas mães. De fato, o meio no qual as fêmeas são testadas podem ter um papel importante, pois, já se sabe que, camundongos lactantes são mais agressivos quando testados na caixa familiar (residente) do que quando testados em meio não-familiar (Paul *et al.*, 1981).

Em roedores, a agressão das fêmeas durante o período pós-parto representa uma adaptação típica da espécie e aumentos da agressividade além deste nível podem representar um modelo de agressão excessiva, que é semelhante a um padrão clínico. Assim, fêmeas no período pós-parto podem ser utilizadas como um modelo de agressividade naturalmente aumentada associadas com a provocação social (Veiga *et al.*, 2010, *in press*).

Importantes sistemas de neurotransmissores estão envolvidos no controle neural do comportamento maternal e da agressividade, como: os benzodiazepínicos GABAérgicos e a serotonina (Ferreira *et al.*, 2000). Barofsky e colaboradores (1983) demonstraram resultados controversos quanto ao controle serotoninérgico do comportamento maternal. Lesões eletrolíticas do núcleo mediano da rafe realizadas antes do parto não afetaram o comportamento maternal (Barofsky, 1978), todavia, lesões neurotóxicas com 5,7 diidroxitriptamina da mesma área encefálica prejudicaram drasticamente o comportamento maternal (Barofsky, 1983).

É geralmente aceito que a expressão da agressividade maternal está inversamente relacionada com a ativação do sistema serotoninérgico (Olivier e Mos, 1992). Foi demonstrado que o uso de agonistas serotoninérgicos da família 5-HT₁, como o 8-OH-DPAT, buspirona e ipsapirona (5-HT_{1A}) reduzem o comportamento agressivo maternal (Olivier e Mos, 1992). O TFMPP é um agonista dos receptores 5-HT_{1B/2C} que também diminui a

agressividade, mas causa prejuízo na atividade locomotora (De Almeida e Lucion, 1994, 1997; Miczek *et al.*, 1998). De Almeida e colaboradores (2005) observaram que o agonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, α -metil-5-hidroxitriptamina maleato, tem efeito inibitório no comportamento agressivo maternal de ratas quando microinjetado na PAG (substância cinzenta periaquedutal).

O comportamento agressivo das ratas com filhotes contra um macho intruso é semelhante ao comportamento de machos dominantes em colônias (Blanchard e Blanchard, 1991). Elas apresentam uma sequência de ataque lateral (comportamento ofensivo), estendendo o dorso, tomando uma postura arqueada, embora seja menos frequente do que observado em machos dominantes (Blanchard e Blanchard, 1991). A maioria das mordidas de machos dominantes em intrusos resulta numa lesão sendo que as fêmeas dificilmente produzem um dano físico. Outra diferença importante é o alvo destas mordidas (Blanchard e Blanchard, 1991). Ao contrário dos machos, uma considerável frequência de mordidas das fêmeas é dirigida à cabeça e à região do focinho do intruso. As fêmeas apresentam o padrão de ataque frontal, o qual não é observado em machos dominantes (Blanchard e Blanchard, 1991). O ataque frontal é um comportamento súbito, muito rápido, pois não apresenta comportamentos associados como piloereção e/ou dorso arqueado. Esta forma de agressão que ocorre em resposta a uma ameaça ou medo é motivada e, geralmente, é precedida por fugas (Brain, 1981). Os alvos das mordidas das fêmeas e a ocorrência de ataque frontal sugerem que existe um elemento de defesa ou medo na reação de uma fêmea em direção a um intruso. Assim, o ataque frontal tem sido considerado como um comportamento defensivo (Blanchard e Blanchard, 1981 a).

De acordo com de Almeida *et al.* (2004) ratas fêmeas provocadas socialmente no sétimo dia pós-parto pela exposição a um camundongo macho aumentam significativamente o

comportamento agressivo, por aumento dos ataques laterais (componente ofensivo) e por aumento de ataques frontais (componente defensivo).

1.3 Circuitos Neurais da Agressividade

Há poucos dados na literatura sobre os substratos neurais envolvidos especificamente na agressão maternal (Lonstein e Gammie, 2002), bem como os mecanismos básicos acerca da agressão maternal em fêmeas lactantes (Insel, 1986; Svare, 1990; Giovenardi *et al.*, 1998; Russel e Leng 1998; Consiglio *et al.* 2005; Nelson e Trainor 2007). A maioria dos estudos sobre agressão está relacionada ao comportamento dos machos e sugere que determinadas áreas encefálicas, como área pré-óptica medial (MPOA), septo lateral (LAS), hipotálamo anterior (AHA), hipotálamo ventromedial (VMH) e núcleo da estria terminal (BNST) estão envolvidas com o comportamento agressivo (Newman, 1999).

Há evidências que a MPOA está envolvida com o comportamento agressivo maternal, pois alguns estudos demonstraram um aumento significativo na atividade neuronal da MPOA e regiões adjacentes, incluindo núcleo pré-óptico medial, em associação com a produção de agressividade maternal (Gammie e Nelson, 1999, 2001; Gammie *et al.*, 2004; Hasen e Gammie, 2005), sugerindo uma relação entre ativação da MPOA e circuito defensivo maternal (Gammie, 2005).

Outros estudos demonstraram que lesões do tálamo, especificamente da região mediodorsal, diminui a agressão maternal, pois esta é uma das regiões que está relacionada com o processamento das informações olfativas (Ferreira *et al.*, 1987; Lonstein e Gaamie, 2002).

Lesões na região do septo prejudicam a agressão maternal em roedores (Flannelly *et al.*, 1986; Gammie, 2005), bem como o ataque ofensivo em machos (Blanchard *et al.*, 1977;

Lonstein e Gaamie, 2002). Todavia, infusão de algumas doses de agonistas do receptor 5-HT_{1A} no septo medial aumenta a frequência de ataques em ratas lactantes (De Almeida e Lucion, 1997; Lonstein e Gammie, 2002), indicando que a atividade serotoninérgica facilita a agressividade das mães (Lonstein e Gammie, 2002).

O núcleo peripeduncular (PPN) do mesencéfalo lateral, transmite aferências relacionadas a atividade das glândulas mamárias para outras regiões como o hipotálamo, estruturas límbicas e mesencéfalo, que são necessárias para o comportamento agressivo (Albert e Walsh, 1984). Lesões no período pós-parto do PPN também diminuem a agressão maternal (Hansen e Ferreria, 1986; Factor *et al.*, 1993).

O VMH é uma região importante para a agressão maternal, pois recebe projeções do PPN (Lonstein e Gammie, 2002). Lesões nessa área, especificamente na parte ventral do VMH, reduzem a agressão maternal em ratos (Hansen, 1989; Lonstein e Gammie, 2002; Gammie, 2005).

Por outro lado, lesões da substância cinzenta periaquedutal (PAG - caudal ventrolateral e lateral) e do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que também são áreas importantes implicadas no controle da agressão maternal em ratos, têm um efeito facilitatório sobre a agressão maternal (Giovenardi *et al.*, 1997, 1998; Lonstein e Stern 1998; Nephew e Bridges, 2008). (Figura 1). De acordo com Bosch *et al.*, (2005), o PVN tem sido implicado na agressão maternal nas mães previamente selecionadas com comportamento semelhante a estados de alta ou pouca ansiedade.

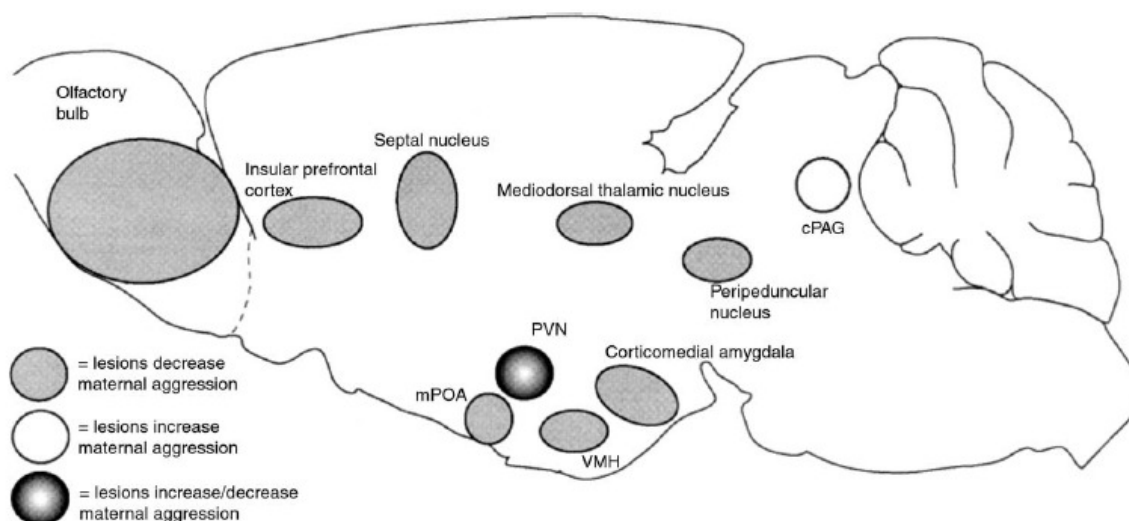


Figura 1 - Esquema representativo resumindo os efeitos das lesões em áreas encefálicas sobre a agressão materna em roedores. (Reproduzido de Lonstein e Gammie, 2002).

Outra região que parece ser um componente importante para a ativação normal do circuito da agressão materna, é a amígdala medial (MeA), que recebe informação dos ferormônios via bulbo olfativo acessório (Gammie, 2005). Camundongos fêmeas lactantes com comportamento agressivo elevado (quando comparados a camundongos com baixos níveis de agressão), expostas a um macho intruso, apresentam significativamente um aumento nos níveis de Fos na MeA (Gammie e Nelson, 2001). Da mesma forma, ratas com comportamento agressivo aumentado quando comparadas a ratas com baixos níveis de agressão, apresentam aumento nos níveis de Fos na MeA em associação com a exposição a um macho intruso (Popeski e Woodside, 2004). Infusão de bicuculina e de 8-OH-DPAT no complexo amigdalóide reduz a agressão materna (Hansen e Ferreira, 1986; De Almeida e Lucion, 1997).

Dessa forma podemos constatar que o trabalho prévio de Veiga *et al.*, (2007) foi o primeiro a demonstrar que a região ventro-orbital do córtex pré-frontal (VO PFC) tem um papel importante sobre o comportamento agressivo maternal de ratas submetidas à provocação social.

1.4 Córtex Pré-Frontal

Em mamíferos, o córtex pré-frontal (PFC) está localizado na parte anterior do lobo frontal, anterior às áreas corticais motora e pré-motora. Tradicionalmente, está dividido em três grandes regiões: áreas orbito-frontal e ventromedial, córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) e córtex cingulado ventral e anterior (De Almeida *et al.*, 2008).

O PFC compreende as áreas de Brodmann 8-13, 24, 25, 32 e 44-47 (Brodmann e Garey, 2006). O PFC dorsal se refere às áreas de Brodmann (BA) de 8 à 10; o DLPFC à BA 46 e a parte ventral à BA 9. A região lateral do PFC compreende à BA 44, 45 e 47. A região orbito-frontal do PFC compreende a BA 11 e 12; a região cingulada anterior à BA 24 e 25 e o córtex da superfície medial à BA 32 (Fallon *et al.*, 2003). O PFC é descrito como uma estrutura que se organiza em seis camadas, como em outras regiões neocorticais e é distinto pela camada IV granular (De Almeida *et al.*, 2008) (Figura 2).

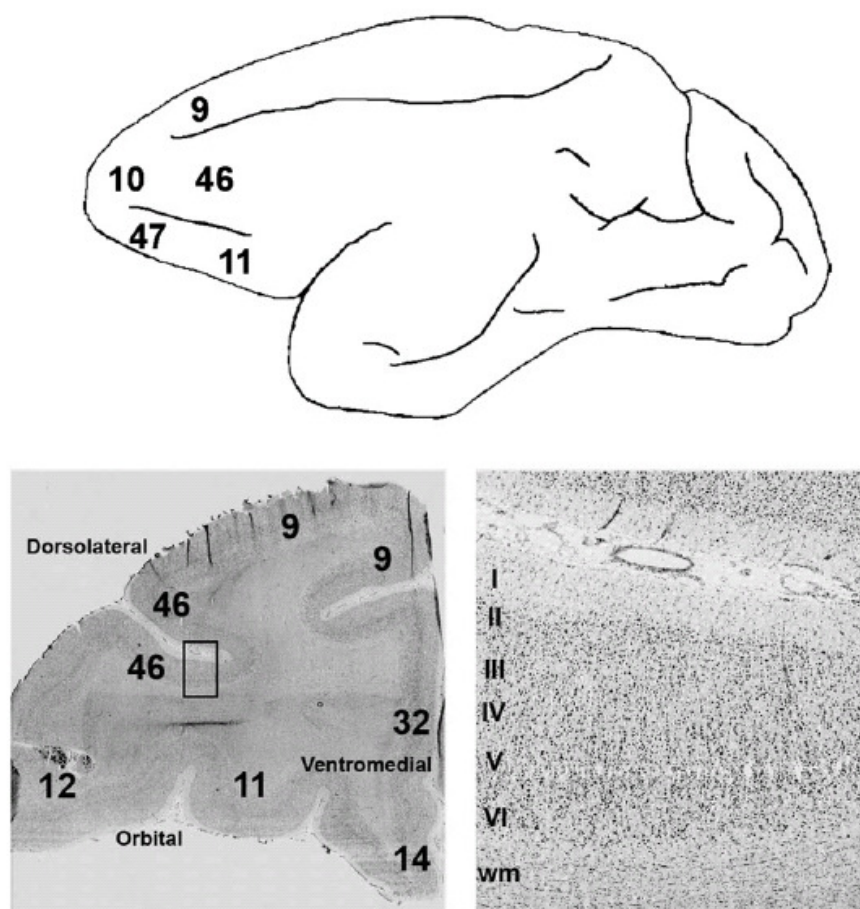


Figura 2 - Córtex pré-frontal. O PFC é um grupo de áreas corticais localizado na parte anterior do lobo frontal (figura acima) do encéfalo de macacos. Um corte coronal do PFC de macacos corado com cresil violeta mostra as principais divisões: orbital, ventromedial e dorsolateral, bem como as áreas de Brodmann (à esquerda). O pequeno retângulo da área 46 é mostrado à direita num aumento maior, onde as seis lâminas estão numeradas, desde a superfície da pia mãe até a substância branca, baseada na densidade e tamanho das células coradas com cresil violeta. (Reproduzido De Almeida *et al.*, 2008).

O córtex pré-frontal da espécie humana apresenta complexas atribuições, como por exemplo, memória de trabalho, atenção, cognição, emoção, controle executivo (Damasio *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1998; Goldman-Rakic, 1999; Varga *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2002; Morgane *et al.*, 2005) e também está implicado nos transtornos de humor (Ebert e Ebmeier, 1996).

As regiões orbital e medial estão envolvidas no controle do comportamento emocional, todavia, a região lateral, altamente desenvolvida em seres humanos, provê suporte cognitivo na organização temporal do comportamento, linguagem e raciocínio, bem como na execução dos comportamentos complexos que requerem memória de trabalho (ver Goldman-Rakic *et al.*, 1984; Fuster, 1997; Cavada *et al.*, 2000; Elston, 2003, para revisão).

O PFC recebe projeções da amígdala (Barbas e Olmos, 1990), do estriado ventral (Kunishio e Haber, 1994) e do tálamo (Barbas *et al.*, 1991). Especificamente, o PFC recebe informação dopaminérgica da área tegmental ventral (VTA) (Lindvall *et al.*, 1978; Berger *et al.*, 1988; Conde *et al.*, 1995) e inervação serotoninérgica do núcleo da rafe mediano e dorsal (Berger *et al.*, 1988; Smiley e Goldman-Rakic, 1996).

O córtex pré-frontal envia projeções glutamatérgicas ao VTA e núcleo acumbens (Sesack e Pickel, 1992; Taber *et al.*, 1995) bem como ao núcleo da rafe (Sesack *et al.*, 1989). O PFC está conectado com outros córtices associativos, mas não com o córtex sensorial primário ou motor (De Almeida *et al.*, 2008). Há uma importante via interna de conectividade entre as diferentes subdivisões do PFC; todavia, cada uma das três grandes regiões pré-frontais (orbital, medial e lateral) está conectada consigo própria e com as outras duas regiões (De Almeida *et al.*, 2008). Algumas das conexões córtico-corticais do PFC são interhemisféricas e a maioria está organizada de forma recíproca e topográfica (Cavada e Goldman-Rakic, 1989).

Recentemente, no córtex pré-frontal, mais especificamente na região orbitofrontal, tem sido identificado uma importante inibição no controle do comportamento, em particular o comportamento impulsivo e agressivo (Blair, 2001; Seguin, 2004; Cardinal *et al.*, 2004; Spinella, 2004; Kheramin *et al.*, 2005).

Em seres humanos, o comportamento violento tem sido correlacionado com déficits do PFC, sugerindo que esta área tem um papel importante no controle inibitório da agressividade (Damásio *et al.*, 1994; Volkow *et al.*, 1995; Golden *et al.*, 1996; Critchley *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Hawkins e Trobst, 2000; Bassarath, 2001; Best *et al.*, 2002; Veit *et al.*, 2002; Blair, 2004). Pessoas com desordens traumáticas e neurodegenerativas envolvendo primariamente o córtex pré-frontal apresentam um aumento nos comportamentos agressivo e antisocial, quando comparados com pessoas que não apresentam desordens ou lesões no córtex frontal (ver Brower e Price, 2001, para revisão).

Estudos têm demonstrado que crianças e adultos com lesões no córtex pré-frontal (especificamente as regiões medial e orbital) apresentam perda de controle em relação às suas emoções, com risco maior de apresentarem comportamentos agressivos, não se preocupando com as possíveis conseqüências de suas ações (Grafman *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1999; Davidson, 2000; Best *et al.*, 2002). Outro trabalho aponta para uma diminuição geral do metabolismo da glicose no córtex pré-frontal de assassinos, através de estudo de imageamento (PET- tomografia por emissão de pósitrons) (Raine *et al.*, 1994; Best *et al.*, 2002).

1.5 Núcleo Dorsal da Rafe Mesencefálica

O núcleo dorsal da rafe (DRN) está localizado na parte ventral da PAG e é o núcleo serotoninérgico mais proeminente do tronco encefálico (Cooper *et al.*, 2008; Ferreira e Menescal-de-Oliveira, 2009).

O DRN contém os receptores 5-HT_{1A} que estão localizados no soma e nos dendritos, onde eles atuam como autorreceptores inibitórios (Miquel *et al.*, 1992; Riad *et al.*, 2000). Agonistas dos receptores 5-HT_{1A} administrados no DRN têm inibido a atividade elétrica do DRN (Sprouse e Aghajanian, 1987), a síntese de serotonina (Hamon *et al.*, 1988) e a liberação de serotonina as regiões nas quais o DRN se projeta (Sharp *et al.*, 1989), como hipocampo, amígdala, hipotálamo e córtex pré-frontal (Azmitia e Segal, 1978; Vertes, 1991; Pyñeyro e Blier, 1999). As vias aferentes ao DRN originam-se de várias áreas encefálicas, como habênula lateral (Aghajanian e Wang, 1977; Stern *et al.*, 1981; Kalén e Wiklund, 1989), hipotálamo (Peyron *et al.*, 1998), substância negra (Stern *et al.*, 1981) e cortex pré-frontal medial (Aghajanian e Wang, 1977; Sesack *et al.*, 1989; Takagishi e Chiba, 1991; Hajós *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998) e também incluem grupos de neurônios catecolaminérgicos (Baraban e Aghajanian, 1980; Peyron *et al.*, 1995, 1996).

Um mecanismo importante de controle dos neurônios 5-HT é dado pela auto-inibição dos receptores 5-HT_{1A}. A ativação destes receptores pela 5-HT conduz a abertura dos canais de potássio na membrana da célula, hiperpolarização da célula e cessação do disparo celular (Sprouse e Aghajanian, 1987; Ferreira e Menescal-de-Oliveira, 2009). Em particular, os autorreceptores 5-HT_{1A} no DRN possuem um papel crucial no controle fisiológico das vias ascendentes de 5-HT, atenuando a ativação excessiva dos neurônios 5-HT pelas aferências excitatórias provenientes de diferentes estruturas do tronco encefálico (Menescal-de-Oliveira, 2009). A proporção estimada dos neurônios contendo serotonina no DRN é de aproximadamente 1/3 a 2/3 (Descarries *et al.*, 1982; Jacobs e Azmitia, 1992; Baumgarten e Grozdanovic, 1997) e o restante das células não serotoninérgicas contém uma variedade de outros neurotransmissores e neuromoduladores (Jacobs e Azmitia, 1992).

1.6 Serotonina

Há mais de quatro décadas, o sistema serotoninérgico tem sido postulado como essencial no controle da agressividade em muitas espécies animais (De Boer e Koolhaas, 2005), desde invertebrados (Kravitz e Huber, 2003) até vertebrados, como répteis (Summers *et al.*, 2003, 2005), peixes (Overli *et al.*, 1999; Perreault *et al.*, 2003), pássaros (Ison *et al.*, 1996) e mamíferos (Miczek *et al.*, 2002), incluindo seres humanos (Tuinier *et al.*, 1995; Berman *et al.*, 1997).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), está localizada em muitas células não neuronais, somente 1 a 2% da quantidade total de serotonina é sintetizada no cérebro (Hillegaart, 1991). A serotonina é produzida inicialmente através da dieta, pelo L-triptofano, o qual é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (Aldegunde *et al.*, 2000).

Após ser formada, a serotonina é transportada e estocada em grânulos (Hillegaart, 1991). Neurônios contendo serotonina estão primariamente localizados no núcleo da rafe do tronco encefálico, cujas projeções se estendem a várias regiões encefálicas de mamíferos, incluindo hipocampo, córtex cerebral, amígdala, hipotálamo e hipófise (Clotfelter *et al.*, 2007).

Depois de sua liberação nas sinapses, a serotonina liga-se a diversas classes de receptores (Hoyer *et al.*, 2002; Clotfelter *et al.*, 2007), que podem ser pré ou pós-sinápticos (Hillegaart, 1991). Em seguida, a serotonina é rapidamente removida pelo seu transportador específico (5-HTT), sendo transportada para uma vesícula sináptica ou degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO) em 5-HIAA (Clotfelter *et al.*, 2007). A atividade serotoninérgica é usualmente demonstrada através da proporção de 5-HIAA:5-HT (Winberg *et al.*, 1992; Buchanan *et al.*, 1994; Koutoku *et al.*, 2003; Dias e Crews, 2006).

O conceito de que a deficiência da atividade serotoninérgica estava relacionada com comportamento impulsivo e com a personalidade de indivíduos violentos (Brown *et al.*, 1979; Linnoila *et al.*, 1983; Mehlman *et al.*, 1994; Mann, 1999; Caramaschi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2010 *submitted*; Neumann *et al.*, 2010) foi aceito por muito tempo. Esta ideia foi suportada através de estudos com seres humanos e primatas não-humanos baseados nas concentrações de 5-HIAA (um metabólito primário da serotonina), coletado no líquido cerebrospinal (CSF). Assim, foi visto uma redução na concentração de 5-HIAA de indivíduos com personalidade anti-social (Brown *et al.*, 1979; Linnoila *et al.*, 1983; Virkkunen *et al.*, 1989, 1994; New *et al.*, 1997; Siever *et al.*, 1999; Siever, 2008) e em macacos impulsivos que foram descritos como violentos em interações sociais (Higley *et al.*, 1992; Mehlman *et al.*, 1994; Higley *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 2002; Higley, 2003; Westergaard *et al.*, 2003).

O tratamento destes indivíduos pode ser realizado através de tratamentos farmacológicos que têm como objetivo inibir os transportadores de 5-HT (utilizando inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como fluoxetina e citalopram), ou ativando os receptores 5-HT_{1A} (buspirona), ou até mesmo bloqueando os receptores 5-HT_{2A} (risperidona). Estas drogas induzem mudanças fásicas no funcionamento da 5-HT que estão associadas com os seus efeitos transitórios anti-agressivos. Por outro lado, o tratamento crônico com estes componentes anti-agressivos pode promover mudanças neuroadaptativas no funcionamento da 5-HT, como por exemplo a dessensibilização dos autorreceptores (Takahaschi *et al.*, 2010, *submitted*).

Estudos pré-clínicos com roedores adicionam suporte a evidência citada acima, hipotetizando a deficiência de serotonina (Ferrari *et al.*, 2005). Outros estudos demonstraram que os SSRIs reduzem a agressividade impulsiva (Coccaro e Kavoussi, 1997).

De fato, a redução de serotonina encefálica pela inibição da síntese de serotonina, com para-clorofenilalanina aumenta algumas formas de agressividade em roedores (Valzelli *et al.*, 1981; Vergnes *et al.*, 1986). De maneira oposta, manipulações farmacológicas, com o intuito de aumentar a atividade encefálica de serotonina, bloqueando a recaptção de serotonina nos terminais sinápticos com tratamento crônico de SSRIs ou aumentando a produção de serotonina com a administração de 5-hidroxitriptofano (um precursor de 5-HT), diminui a agressividade (Nelson e Chiavegatto, 2001; Olivier, 2004).

Por outro lado, alguns estudos têm mostrado evidências contraditórias, em relação aos níveis de 5-HIAA e comportamento agressivo, pois, algumas vezes, ocorre uma correlação negativa entre 5-HIAA e comportamento agressivo em primatas e roedores (Yodyingyuad *et al.*, 1985; Volavka *et al.*, 1990; van der Vegt *et al.*, 2003 a).

Através da técnica da microdiálise in vivo, tem sido possível monitorar as mudanças na atividade serotoninérgica durante os confrontos agressivos em ratos (van Erp e Miczek, 2000; Ferrari *et al.*, 2003). Com esta metodologia pode-se monitorar em tempo real, a liberação de serotonina extracelular, de estruturas corticolímbicas, em fases distintas de um confronto agressivo: antes, durante e após o confronto (Ferrari *et al.*, 2005).

Estudos com microdiálise revelam que, durante um breve episódio de agressividade em ratos residentes, ocorre uma diminuição nos níveis de serotonina no córtex pré-frontal, mas não no núcleo accumbens (van Erp e Miczek, 2000; Ferrari *et al.*, 2003). A diminuição de 5-HT no córtex pré-frontal é prolongada e pode persistir por uma hora após o final do confronto (Ferrari *et al.*, 2005).

Em ratos machos residentes, que são condicionados a atacar um intruso, num período de dez dias, exatamente ao mesmo tempo, os níveis de serotonina no núcleo accumbens diminuem de 30 a 35%, quando comparados com os níveis basais, no 11º dia, antes do confronto (Ferrari *et al.*, 2003).

Resultados *in vivo* de microdiálise em camundongos também mostraram uma supressão de 30-40% dos níveis extracelulares de serotonina no córtex pré-frontal medial, após administração sistêmica de um agonista dos receptores 5-HT_{1B} (CP-94,253), na dose de 10 mg/kg (Faccidomo *et al.*, 2005; De Almeida *et al.*, 2006).

Dessa forma, todos esses experimentos indicam que o comportamento agressivo está associado com mudanças agudas nos níveis de serotonina, em estruturas corticolímbicas (Ferrari *et al.*, 2005).

O sistema serotoninérgico também está envolvido com o comportamento impulsivo (Linnoila *et al.*, 1983; Harrison *et al.*, 1997; Puumala e Sirviö, 1998; Evenden, 1999; Mobini *et al.*, 2000). O termo impulsividade é usualmente reservado para más adaptações comportamentais (Linnoila *et al.*, 1983; Harrison *et al.*, 1997 a; Puumala e Sirviö, 1998; Evenden, 1999 b; Mobini *et al.*, 2000).

Quando a atividade serotoninérgica central é reduzida, direta ou indiretamente, ocorre a tendência de predisposição impulsiva (Linnoila *et al.*, 1983; Wogar *et al.*, 1993; Fairbanks *et al.*, 2001; Mobini *et al.*, 2000). Surtos de agressividade são sintomas freqüentes de impulsividade. Antidepressivos não-seletivos, inibidores irreversíveis da monoaminoxidase, tranilcipromina e o SSRI fluoxetina (Coccaro *et al.*, 1990; Cornelius *et al.*, 1991; Markovitz, 1995), bem como a sertralina (Kavoussi *et al.*, 1994) podem ser efetivos no tratamento da impulsividade. Estes dados sugerem que cada droga pode ser usada no tratamento das medidas de impulsividade e da agressividade. O mecanismo é talvez relacionado a sua habilidade em estabilizar os níveis de serotonina (Evenden, 1999).

O sistema serotoninérgico regula numerosas funções fisiológicas como o sono, termorregulação e padrões de comportamento (Wilkinson e Dourish, 1991). A serotonina também está envolvida com a regulação do apetite, ritmo circadiano, atividade locomotora, comportamento sexual, memória, vigilância, nocicepção, enxaqueca, emoção, medo e

processos cognitivos (Parent *et al.*, 1981; Steinbusch, 1981; Sari, 2004; Dugovic, 2001; Jacobs e Formal, 1991, 1999; Meneses, 1999; Sodero *et al.*, 2006). Alterações do sistema serotoninérgico estão ligadas a muitas desordens neuropsiquiátricas como depressão, ansiedade e agressividade (Sleight e Peroutka, 1991; Sari, 2004; Neumann *et al.*, 2010).

A multiplicidade destas funções fisiológicas e comportamentais na qual a serotonina está envolvida, ocorre, em parte, pela sua ampla distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Periférico (SNP) e, também, pela diversidade de receptores (Boess e Martin, 1994; Hoyer *et al.*, 1994).

O sistema serotoninérgico é um sistema complexo e possui 14 subtipos de receptores: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ e 5-HT₇. A família dos receptores serotoninérgicos é formada em parte por duas superfamílias de genes: a superfamília dos receptores acoplados à proteína G e a superfamília dos canais iônicos. Os receptores 5-HT_{1,2,4,5,6} e 7 estão relacionados com a modulação da adenilato ciclase ou do fosfoinositol via ativação de proteínas G, já, os receptores 5-HT₃ estão relacionados com a modulação de canais iônicos (Olivier e Oorschot, 2005).

A atividade dos neurônios serotoninérgicos é regulada por dois tipos de autorreceptores: 5-HT_{1A} e 1B e também, pelo transporte de serotonina (Piñeyro e Blier, 1999; Olivier e Oorschot, 2005) (Figura 4). Durante o disparo neuronal, a serotonina é liberada dos terminais e ativa os receptores serotoninérgicos. A regulação do disparo e liberação de serotonina são controlados por mecanismos de retroalimentação, que modulam a atividade do neurônio serotoninérgico. O primeiro mecanismo de modulação da atividade serotoninérgica consiste nos transportadores de serotonina, que estão localizados nos terminais sinápticos e, também, os corpos celulares e os dendritos dos neurônios serotoninérgicos que carregam serotonina de volta para o neurônio. Este processo é denominado de recaptação de serotonina, muito importante para restaurar as condições normais de disparo da célula e evitar a

superestimulação dos receptores. Outro mecanismo que contribui para cessar o disparo celular e controlar a liberação de serotonina é a ativação dos autorreceptores 5-HT_{1B} nos terminais sinápticos, conduzindo a uma inibição direta da liberação de serotonina. Um terceiro mecanismo é constituído pelos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} que também inibem a liberação de serotonina (Piñeyro e Blier, 1999; Adell *et al.*, 2002; Olivier e Oorschot, 2005).

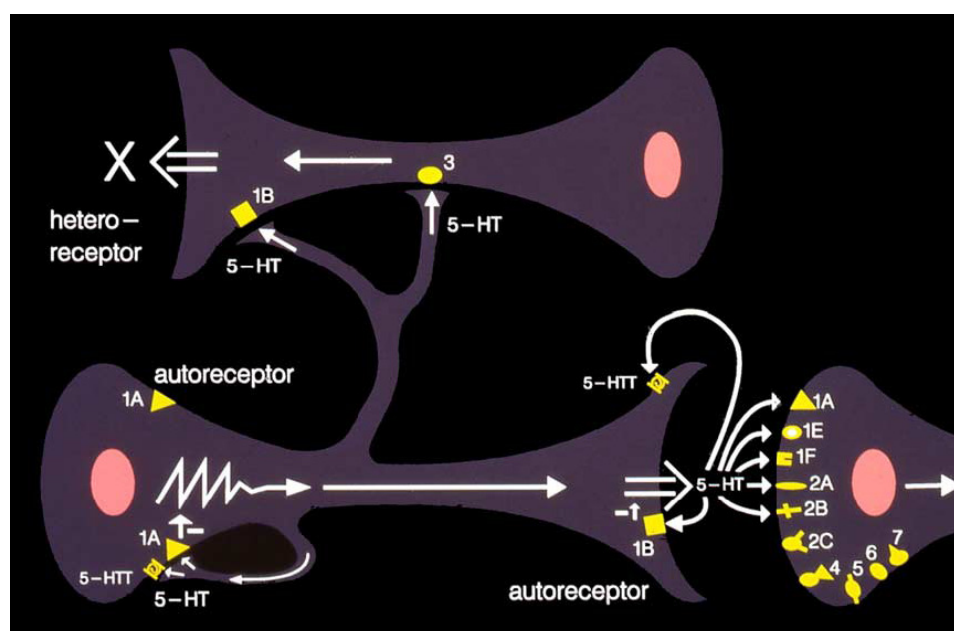


Figura 3 - Esquema representativo de um neurônio serotoninérgico demonstrando a localização dos receptores 5-HT (autorreceptores e heterorreceptores). (Reproduzido de Olivier e Oorschot, 2005).

Experimentos pré-clínicos têm mostrado evidências importantes dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂, em relação ao comportamento agressivo (Olivier *et al.*, 1989 a; Olivier e Mos, 1992; Barret e Vanover, 1993; De Almeida e Lucion, 1994, 1997; De Almeida *et al.*, 2005 a), bem como algumas evidências iniciais do envolvimento dos receptores 5-HT₃ sobre a agressividade (Rudissaar *et al.*, 1999; Ricci *et al.*, 2004; McKenzie-Quirk *et al.*, 2005; Takahaschi *et al.*, 2010, *submitted*).

1.6.1 Receptores 5-HT_{1A}

Os receptores 5-HT_{1A} além de se localizarem somatodendriticamente no DRN como exposto anteriormente (seção 1.5), podem estar localizados pós-sinápticamente em regiões límbicas como o hipocampo, amígdala, núcleo da estria terminal, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e septo, onde eles atuam como heterorreceptores sob os neurônios não serotoninérgicos e inibem a liberação de outros neurotransmissores (Pazos e Palacios, 1985; Hensler *et al.*, 1991, Pompeiano *et al.*, 1992; Kia *et al.*, 1996; Barnes e Sharp, 1999; Santana *et al.*, 2004; Lambas-Señas *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Clinicamente, agonistas parciais do receptor 5-HT_{1A} como bupiriona, podem reduzir o comportamento agressivo em pacientes com retardo mental (Ratey *et al.*, 1991; Kavoussi *et al.*, 1997). Este componente também tem sido usado para o tratamento de surtos agressivos associados com desordens neuropsiquiátricas em adultos e crianças (Connor e Steingard, 1996; Pabis e Stanislav, 1996). Todavia, efeitos fisiológicos foram reportados pela bupiriona e outros agonistas 5-HT_{1A}, limitando dessa forma a sua utilização clínica, como ferramentas no tratamento da agressividade (Takahashi *et al.*, 2010, *submitted*).

Investigações pré-clínicas com administração sistêmica de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} promovem efeitos anti-agressivos em várias espécies de animais, incluindo peixes, anfíbios, pássaros, roedores, porcos da Índia e primatas não humanos (Tompkins *et al.*, 1980; Dompert *et al.*, 1985; Lindgren e Kantak, 1987; Blanchard *et al.*, 1988; McMillen *et al.*, 1988; Haug *et al.*, 1990; Nikulina *et al.*, 1992; Olivier *et al.*, 1992; Sanchez *et al.*, 1993; Bell e Hobson, 1994; Muehlenkamp *et al.*, 1995; Joppa *et al.*, 1997; Miczek *et al.*, 1998; de Boer *et al.*, 1999, 2000; Sperry *et al.*, 2003; de Boer e Koolhaas, 2005; Clotfelter *et al.*, 2007; Ten Eyck, 2008). Somente com exceção de um estudo, na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* foi reportado um aumento do comportamento agressivo após o tratamento com o agonista dos receptores 5-HT_{1A}, o 8-OH-DPAT (Johnson *et al.*, 2009).

O 8-OH-DPAT ($pK_i=8.7$) é amplamente utilizado em estudos que caracterizam os efeitos comportamentais dos receptores $5-HT_{1A}$, incluindo comportamento agressivo (Centenaro *et al.*, 2008).

Antagonistas seletivos dos receptores $5-HT_{1A}$, como WAY-100635, bloqueiam os efeitos anti-agressivos dos agonistas $5-HT_{1A}$ (Miczek *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 1999; De Boer e Koolhaas, 2005).

Estudos têm demonstrado que os efeitos anti-agressivos dos agonistas $5-HT_{1A}$ em vertebrados são acompanhados de efeitos não específicos, incluindo sedação, diminuição da atividade motora, comportamento estereotipado ou redução do interesse social (Olivier *et al.*, 1995; Joppa *et al.*, 1997; Miczek *et al.*, 1998; De Boer e Koolhaas, 2005). Todavia, alguns agonistas $5-HT_{1A}$, como alnespirona e S-15535, podem reduzir o comportamento agressivo sem afetar outros comportamentos não agressivos (De Boer *et al.*, 1999, 2000; De Boer e Koolhaas, 2005). É possível que estes fármacos atuem numa subpopulação de receptores $5-HT_{1A}$ para exercerem este efeito anti-agressivo (Takahashi *et al.*, 2010, *submitted*).

1.6.2 Receptores $5-HT_{1B}$

Tem-se demonstrado que os receptores $5-HT_{1B}$ estão envolvidos em funções fisiológicas importantes, comportamentais e doenças psiquiátricas, incluindo a atividade locomotora, drogas de abuso, enxaqueca, estados de ansiedade e no comportamento agressivo (Kennett *et al.*, 1987; Blier *et al.*, 1988; Griebel *et al.*, 1990; Fernandez-Guasti *et al.*, 1992; O'Connor e Kruk, 1994; Saudou *et al.*, 1994; Boulenguez *et al.*, 1995; Ramboz *et al.*, 1996; Millan e Perrin-Monneyron, 1997; Clark *et al.*, 2002; Lin e Parsons, 2002; Kaiyala *et al.*, 2003).

Os receptores $5-HT_{1B}$ foram encontrados inicialmente em roedores (ratos, camundongos e hamsters) (Pedigo *et al.*, 1981; Hamon *et al.*, 1986; Sari, 2004) mas são

funcionalmente homólogos ao receptor 5-HT_{Dβ} encontrado em seres humanos, sendo que a única diferença está num aminoácido (Asparagina X Treonina) no sexto domínio transmembrana do receptor (Metcalf *et al.*, 1992; Oksenberg *et al.*, 1992; Sari, 2004).

Os receptores 5-HT_{1B} estão localizados em regiões encefálicas relacionadas com o comportamento agressivo e impulsivo, particularmente o PFC (Hoyer *et al.*, 1985; Bruinvels *et al.*, 1993, 1994; Sari *et al.*, 1999; Sari, 2004). Estudos autorradiográficos também demonstram uma elevada densidade de receptores 5-HT_{1B} nos gânglios basais (particularmente na substância nigra, globo pálido, pálido ventral e núcleo entopeduncular), e em muitas outras regiões (Pazos e Palacios, 1985; Verge *et al.*, 1986; Bruinvels *et al.*, 1993). Por outro lado, foi demonstrada uma densidade moderada dos receptores 5-HT_{1B} no córtex cerebral, camada molecular do hipocampo, núcleo entopeduncular, camada cinzenta molecular do colículo superior, putâmen e caudado (Pazos e Palacios, 1985; Bruinvels *et al.*, 1993; Boulenguez *et al.*, 1996; Sari *et al.*, 1999 e Sari, 2004).

Os receptores 5-HT_{1B} são pré e pós-sinápticos. A localização anatômica dos receptores 5-HT_{1B} evidencia a ideia que os receptores 5-HT_{1B} têm um papel como autorreceptores e heterorreceptores, isto é, controlam a liberação de importantes neurotransmissores (Engel *et al.*, 1986; Hen, 1992; Barnes e Sharp, 1999), como glutamato (Tanaka e North, 1993; Hasegawa *et al.*, 2006), GABA (Stanford e Lacey, 1996; Hasegawa *et al.*, 2006), acetilcolina (Maura e Raiteri, 1986; Hasegawa *et al.*, 2006) e dopamina (Sarhan *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2006).

A ativação dos receptores pré-sinápticos 5-HT_{1B} inibe a liberação de serotonina e diminui as concentrações extracelulares de serotonina no córtex, hipocampo ventral, estriatum e diencéfalo (Engel *et al.*, 1986; Hoyer e Middlemiss, 1989; Hjörth e Shap, 1991; Chopin *et al.*, 1994; Martin e Humphrey, 1994; Rollema *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1997; Knobelmann *et al.*, 2000) (ver Sari, 2004, para revisão).

Camundongos nocaute para o receptor 5-HT_{1B} são animais que não apresentam expressão deste receptor. Estes animais têm deletado o gene que codifica o receptor 5-HT_{1B} (^{Htr1b^{-/-}}) e apresentam níveis elevados de agressividade no teste residente/ intruso, após um mês de isolamento, quando comparados com residentes que expressam esse receptor (Bouwknicht *et al.*, 2001). Os camundongos nocaute também apresentam desinibição comportamental em outros testes, incluindo atividade hiperlocomotora (Ramboz *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1999), aumento no consumo de álcool e cocaína (Crabbe *et al.*, 1996, 1999; Rocha *et al.*, 1998), ansiedade (Brunner *et al.*, 1999; Malleret *et al.*, 1999) e hiperatividade autonômica frente a um novo meio (Bouwknicht *et al.*, 2001). Fêmeas Htr1b^{-/-} também aumentam o comportamento agressivo durante o período pós-parto (Brunner e Hen, 1997). Assim, todos esses resultados sugerem que os receptores 5-HT_{1B} atuam na inibição dos comportamentos agressivo e impulsivo (Takahashi *et al.*, 2010, *submitted*).

Estudos têm demonstrado que agonistas específicos dos receptores 5-HT_{1B}, como CP-93,129, CP-94,253, anpirtolina, TFMPP e zolmitriptan, promovem uma notável inibição do comportamento agressivo e não alteram os demais comportamentos (Fish *et al.*, 1999; De Almeida *et al.*, 2001; Miczek *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2007). Agonistas dos receptores 5-HT_{1B} têm se mostrado mais seletivos sobre o comportamento agressivo de camundongos, quando comparados com agonistas que atuam em receptores 5-HT_{1A} (Miczek *et al.*, 2004; Olivier, 2004; De Boer e Koolhaas, 2005).

O CP-93,129 é um agonista seletivo dos receptores 5-HT_{1B} com uma alta afinidade de ligação para este receptor (pK_i=8,1) (Millan *et al.*, 2002), bem como seu antagonista, o SB-224,289 (pK_i=8,2), quando comparado com outros subtipo de receptores (Roberts *et al.*, 2001). Adicionalmente, o CP-93,129 não apresenta nenhuma afinidade por outro sistema de neurotransmissor, como o sistema dopaminérgico, adrenérgico ou opiáceo (Macor *et al.*,

1990). Com estas características, o CP-93,129 pode ser caracterizado como um seletivo e altamente específico ligante dos receptores 5-HT_{1B} (Hasegawa *et al.*, 2005).

1.7 Aumento do Comportamento Agressivo

Em espécies sociais, o comportamento agressivo pode servir como uma importante função adaptativa. Todavia, quando este tipo de comportamento excede os padrões típicos das espécies, ele pode ser considerado um comportamento maladaptativo (De Almeida *et al.*, 2005 a).

Parte considerável do que hoje se sabe sobre a etiologia, neurobiologia e em particular sobre a farmacologia da agressividade em seres humanos é baseada nos modelos experimentais desenvolvidos em animais de laboratório (de Boer e Koolhaas, 2005). Níveis excessivos de comportamento agressivo podem ser induzidos em animais de laboratório através: 1) do uso de fármacos; 2) protocolos experimentais, tais como a provocação e a frustração social, ou 3) por seleção genética (de Boer e Koolhaas, 2005).

O álcool tem sido associado com atos de violência e agressão (Faccidomo *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos da América é o fármaco mais envolvido em muitos tipos de comportamento agressivo (Chermack e Giancola, 1997; Brown *et al.*, 1999; Fulwiler *et al.*, 2005), em mais de 50% de todos os crimes de violência (Murdoch *et al.*, 1990) e acima de 86% dos assassinatos (Roizen, 1997). Todavia, o álcool pode diminuir a agressividade em muitas espécies animais, como em camundongos, ratos, macacos e em seres humanos, presumivelmente devido aos seus efeitos sedativos (Krsiak e Borgesova, 1973; Smoothy e Berry, 1983).

Em doses baixas a moderadas, o álcool aumenta significativamente a agressividade em determinados indivíduos (Miczek e Barry, 1977; Peeke e Figler, 1981; Cherek *et al.*, 1984; Blanchard *et al.*, 1987; Miczek *et al.*, 1992, 1994; Berry, 1993; Van Erp e Miczek,

1997; De Almeida *et al.*, 2001; Miczek e de Almeida, 2001; De Almeida e Miczek, 2001; Faccidomo *et al.*, 2008). De Almeida e colaboradores (2010) mostraram recentemente que a agressividade de camundongos e ratos machos aumenta significativamente após consumo de doses moderadas de etanol (1 g/Kg). Também tem sido demonstrado que alguns indivíduos são sensíveis aos efeitos de doses moderadas de álcool, pela agressividade escalada (ou instigada), enquanto outros não o são (Chance *et al.*, 1973; Peeke *et al.*, 1973; Miczek e O'Donnell, 1980; Lister e Hilakivi, 1988; Miczek *et al.*, 1993, 2004; Faccidomo *et al.*, 2008).

A frustração social não recompensada é um processo motivacional, definida pela omissão ou descontinuidade de um reforço (ver Dollard *et al.*, 1939; Amsel e Roussel, 1952; Azrin *et al.*, 1966; Thompson e Bloom, 1966; Kelly, 1974; De Almeida e Miczek, 2002). Surto de agressividade podem ser observados após a retirada de um reforço de recompensa em diferentes espécies, como peixes, pássaros, roedores, macacos e seres humanos (Thompson e Bloom, 1966; Cherek e Pickens, 1970; Caprara, 1982; Evenden e Ryan, 1996). O protocolo da frustração social aumenta praticamente em dobro a frequência dos ataques em direção a um estímulo oponente, após a omissão da recompensa (neste caso sacarose), quando comparado com o comportamento agressivo do animal no qual a recompensa está sendo disponibilizada (De Almeida e Miczek, 2001). Este protocolo experimental também demonstrou se repetir ao longo de vários meses (De Almeida e Miczek, 2001).

Em relação ao aumento de comportamento agressivo por seleção genética, camundongos “knockout” têm sido utilizados para identificar os genes que podem contribuir para a agressividade (Gammie e Nelson, 1999; Del Punta *et al.*, 2002; Stowers *et al.*, 2002; Gammie *et al.*, 2005).

Selecionar linhagens específicas de animais que apresentem comportamento agressivo elevado tem sido uma ferramenta usada em grande número de estudos para ajudar a elucidar as bases genéticas do comportamento agressivo (Gammie *et al.*, 2006). Por exemplo,

camundongos machos (van Oortmerssen e Bakker, 1981; Sandnabba, 1996; Veenema e Neumann, 2007) com altos níveis de agressividade e fêmeas não maternais (Hyde e Sawyer, 1980) com agressão aumentada são previamente selecionados. Camundongos fêmeas lactantes também podem ser previamente selecionados a apresentarem comportamento agressivo maternal, através de seleção genética (Gammie *et al.*, 2006).

A provocação social, objeto deste estudo, é um protocolo experimental utilizado para elevar os níveis de agressividade típicos da espécie (Veiga *et al.*, 2010, *in press*), sendo utilizado em ratos e camundongos de laboratório. (Figura 3).

O aumento do comportamento agressivo é resultante da exposição a um oponente por um curto período de tempo, colocado atrás de um anteparo, antes do confronto social (Potegal, 1991). Este procedimento é denominado provocação social ou instigação social. Em geral, hamsters, camundongos e ratos iniciam ataques com uma pequena latência e com altas frequências quando testados com um intruso em suas caixas ou em um meio não-familiar, após terem sido provocados previamente na presença de um oponente (Potegal, 1991; Fish *et al.*, 1999; de Almeida e Miczek, 2002; Centenaro *et al.*, 2008). A provocação social não afeta o padrão locomotor, a alimentação ou o comportamento sexual em machos (Lagerspetz e Hautojarvi, 1967; Potegal e Tenbrink, 1984; Potegal, 1992; Fish *et al.*, 1999; de Almeida e Miczek, 2002; de Almeida *et al.*, 2004).

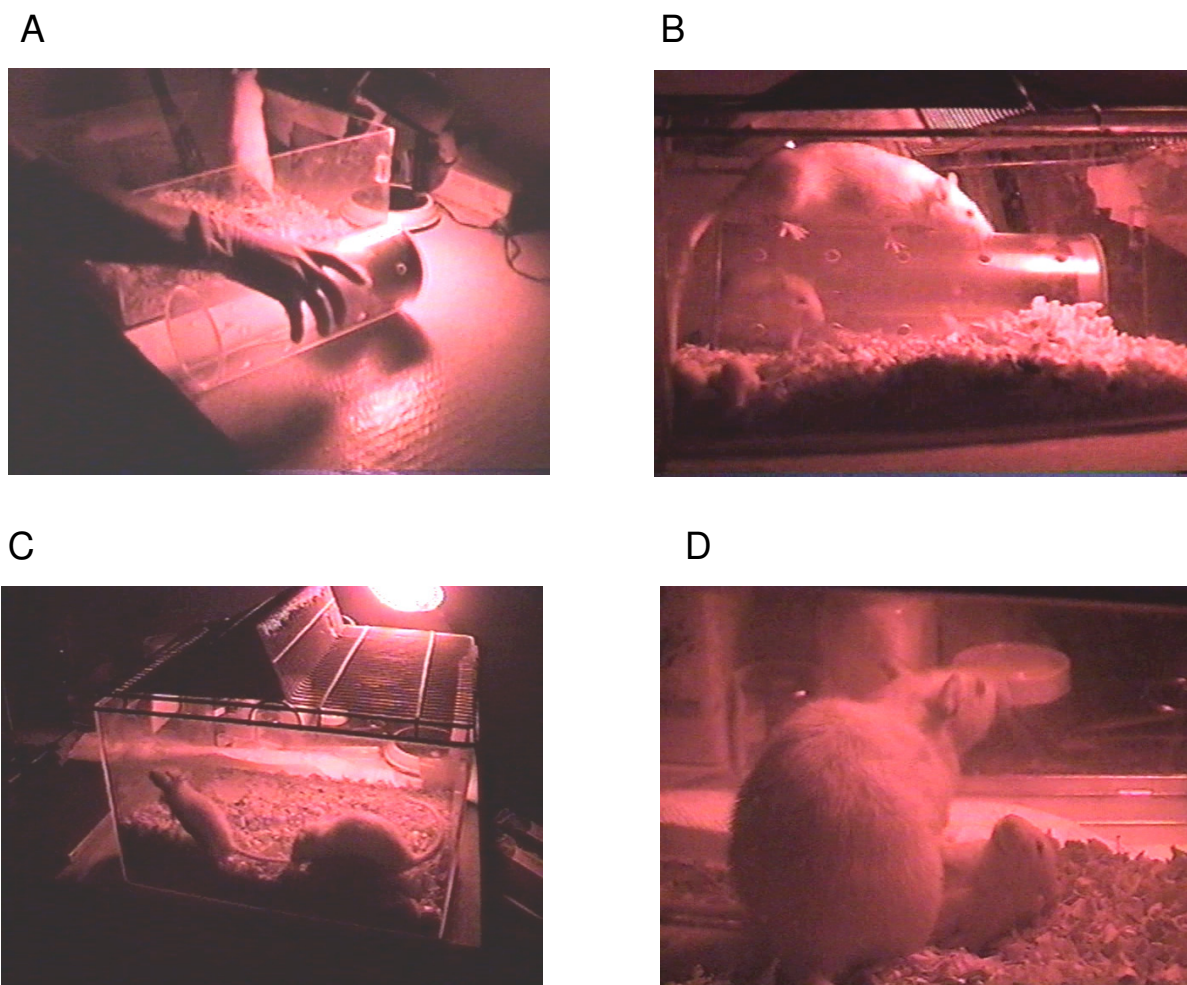


Figura 4 - Provocação Social. A: tubo com o provocador sendo introduzido na caixa da fêmea residente. B: Comportamento de investigação pela fêmea. C: A fêmea cheirando o intruso. D: Comportamento agressivo de dominar o intruso.

A provocação social compreende mudanças comportamentais (aumento do comportamento agressivo), fisiológicas e neuroquímicas (diminuição dos níveis serotoninérgicos no hipotálamo e córtex pré-frontal medial) (Payne *et al.* 1984, van Erp e Miczek, 2000). Todos estes comportamentos que ocorrem nos animais submetidos à provocação social podem corresponder a condições psiquiátricas (Valzelli, 1973).

De Almeida e Miczek (2002), utilizando a provocação social, observaram aumentos do repertório comportamental agressivo, mas não em elementos comportamentais não-agressivos, como a locomoção. Fish e colaboradores (1999) demonstraram que a exposição a um camundongo macho adulto aumenta a agressividade, todavia outros estímulos como um camundongo juvenil ou uma fêmea não foram suficientes para gerar altos níveis de agressividade.

O desenvolvimento de protocolos experimentais para aumentar os níveis de comportamento agressivo, principalmente em camundongos, aproxima-se de padrões comportamentais clínicos (De Almeida e Miczek, 2002). Tratamentos farmacológicos em animais que apresentam comportamento agressivo simulam os comportamentos de agressividade em seres humanos (Eichelman, 1990, 1992; Miczek *et al.*, 1994). Estudos dos mecanismos neurais de agressão podem contribuir para a nossa compreensão a respeito dos mecanismos de intervenção farmacoterapêutica no comportamento agressivo humano (Ueda *et al.*, 1999).

Dessa forma, o objetivo de se utilizar a provocação social é aumentar o comportamento agressivo dos animais. Ratas, por exemplo, apresentam uma frequência basal de comportamento agressivo bastante reduzido, assim, submetê-las a provocação social é uma forma de aumentar seus níveis de agressividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo do comportamento agressivo utilizando modelos experimentais animais torna-se uma ferramenta de vital importância para o entendimento das bases neurobiológicas da agressividade em seres humanos. Dessa forma, torna-se imprescindível tentar estabelecer, pelo menos em parte, a circuitaria que está relacionada com o comportamento agressivo. Tendo em vista que muito do que se sabe até o momento tem como base estudos animais realizados com machos, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o papel dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no núcleo dorsal da rafe mesencefálica e no córtex pré-frontal, respectivamente, de ratas lactantes submetidas à provocação social.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se os receptores 5-HT_{1B} localizados especificamente na região VO PFC, são importantes para o controle do comportamento agressivo em fêmeas no período pós-parto, provocadas socialmente;
- Verificar a especificidade do receptor 5-HT_{1B} na atenuação do comportamento agressivo através da microinjeção do antagonista dos receptores 5-HT_{1B}: SB-224,289 no VO PFC de ratas fêmeas no período pós-parto, provocadas socialmente;
- Verificar se os agonistas dos receptores 5-HT_{1A}:8-OH-DPAT e 5-HT_{1B}: CP-93,129 microinjetados especificamente no DRN e no VO PFC, respectivamente e

simultaneamente, podem reduzir o comportamento agressivo aumentado de ratas provocadas socialmente;

- Analisar se a redução do comportamento agressivo ocorre através da ativação dos receptores pré (5-HT_{1A}) ou pós-sinápticos (5-HT_{1B}).

ARTIGO 1

SOCIAL INSTIGATION E AGGRESSION IN POSTPARTUM FEMALE RATS: ROLE
OF 5-HT_{1A} E 5-HT_{1B} RECEPTORS IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS AND
PREFRONTAL CORTEX

Artigo aceito para publicação na revista Psychopharmacology

CARTA DE ACEITE DO ARTIGO

30-Oct-2010

Manuscript No. Psych-2009-00615.R4

Title : SOCIAL INSTIGATION AND AGGRESSION IN POSTPARTUM FEMALE RATS: ROLE OF 5-HT1A AND 5-HT1B RECEPTORS IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS AND PREFRONTAL CORTEX

By: da Veiga, Caroline; Miczek, Klaus; Lucion, Aldo; de Almeida, Rosa

Dear Dr. de Almeida,

We are pleased to inform you that your manuscript Psych-2009-00615.R4, entitled "SOCIAL INSTIGATION AND AGGRESSION IN POSTPARTUM FEMALE RATS: ROLE OF 5-HT1A AND 5-HT1B RECEPTORS IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS AND PREFRONTAL CORTEX", has been accepted for publication in Psychopharmacology.

The manuscript will now be forwarded to the publisher, from whom you will shortly receive information regarding the correction of proofs and fast online publication. The manuscript will be included in a special issue of Psychopharmacology titled: Serotonin Revisited. The manuscript is due to be published at the beginning of next year.

Should you have any questions regarding publication of your paper, please contact the responsible production editor, Mr. Luz Narvasa at luz.narvasa@springer.com.

Best wishes and thanks,
Irwin

Dr. Irwin Lucki
Principal Editor
Psychopharmacology

Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-Ht1A and 5-Ht1B receptors in the dorsal raphé nucleus and prefrontal cortex

Psychopharmacology

ISSN 0033-3158

Volume 213

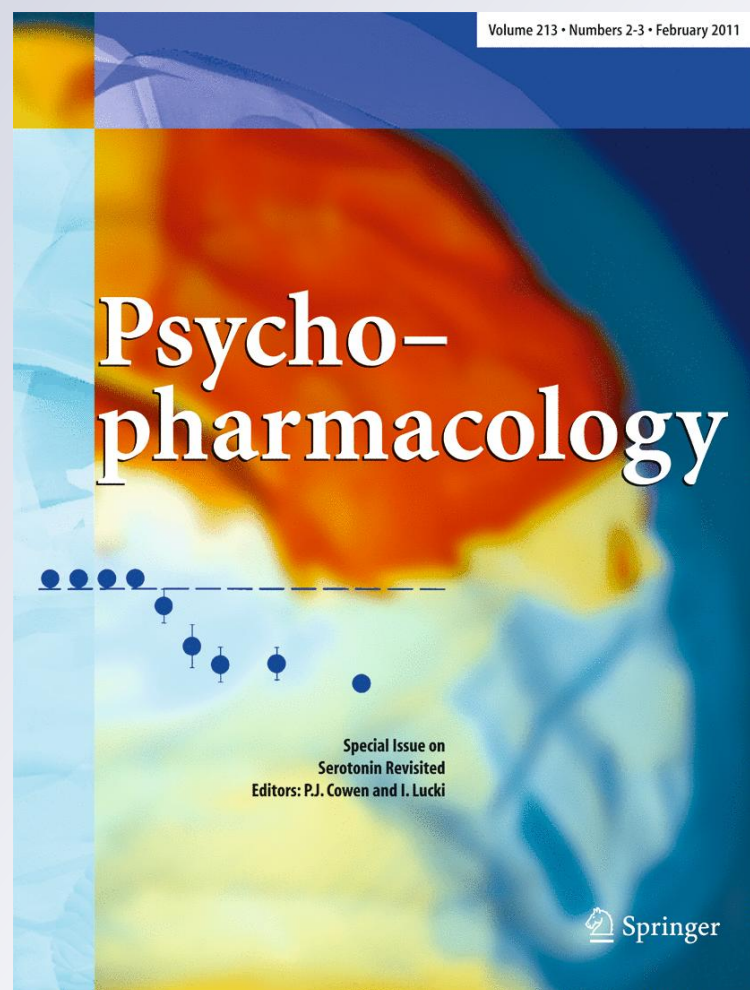
Combined 2-3

Psychopharmacology (2010)

213:475-487

DOI 10.1007/

s00213-010-2083-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus and prefrontal cortex

Caroline Perinazzo da Veiga · Klaus A. Miczek ·
Aldo Boltzen Lucion · Rosa Maria Martins de Almeida

Received: 22 December 2009 / Accepted: 30 October 2010 / Published online: 24 November 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract

Rationale 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists effectively reduce aggressive behavior in males that has been escalated by social instigation. Important sites of action for these drugs are the receptors in dorsal raphe nuclei (DRN) and the ventral–orbital prefrontal cortex (VO PFC). DRN and VO PFC areas are particularly relevant in the inhibitory control of escalated aggressive and impulsive behavior.

Objectives The objectives of this study are to assess the anti-aggressive effects of 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) and 5-HT_{1B} (CP-93,129) receptor agonists microinjected into DRN and VO PFC, respectively, and to study the aggressive behavior in postpartum female Wistar rats using the social instigation protocol to increase aggression.

Methods and Results 8-OH-DPAT (0.56 µg) in the DRN increased aggressive behavior in postpartum female rats. By contrast, CP-93,129 (1.0 µg) microinjected into VO

PFC decreased the number of attack bites and lateral threats. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists differed in their effects on non-aggressive activities, the former decreasing rearing and grooming and the latter increasing these acts. When 8-OH-DPAT was microinjected into DRN and CP-93,129 was microinjected into VO PFC in female rats at the same time, maternal aggression decreased. Specific participation of 5-HT_{1B} receptors was verified by reversal of the anti-aggressive effects using the selective antagonist SB-224,289 (1.0 µg).

Conclusions The decrease in maternal aggressive behavior after microinjections of 5-HT_{1B} receptor agonists into the VO PFC and DRN of female postpartum rats that were instigated socially supports the hypothesis that activation of these receptors modulates high levels of aggression in a behaviorally specific manner, due to activation of 5-HT_{1B} receptors at the soma and terminals.

C. P. da Veiga
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

K. A. Miczek
Department of Psychology, Tufts University,
Medford and Boston, MA, USA

K. A. Miczek
Department of Pharmacology, Tufts University,
Medford and Boston, MA, USA

K. A. Miczek
Department of Neuroscience, Tufts University,
Medford and Boston, MA, USA

K. A. Miczek
Department of Psychiatry, Tufts University,
Medford and Boston, MA, USA

A. B. Lucion
Departamento de Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

R. M. M. de Almeida (✉)
Instituto de Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
e-mail: rosa_almeida@yahoo.com

R. M. M. de Almeida
e-mail: rosa.almeida@ufrgs.br

R. M. M. de Almeida
Laboratório de Psicologia Experimental,
Neurociências e Comportamento,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Keywords 8-OH-DPAT · CP-93,129 · Provocation · Female · 5-HT

Introduction

Postpartum aggression in female rodents represents a species-typical adaptation, and escalations beyond this level may model excessive aggression that is of clinical concern. In this sense, postpartum females were used as a model of naturally heightened aggression. In rats, maternal aggressive behavior occurs more frequently from days 3 to 12 after delivery, and during this period, females show intense care directed at the pups (Consiglio and Bridges 2009; Erskine et al. 1978).

In order to enhance the translational value, this type of aggression in postpartum females was escalated by social instigation to engender levels of aggression exceeding the normal species-typical responses. The social instigation procedure has proven to be a highly effective way to increase aggressive behavior in male animals by provoking or instigating a territorial resident through the close proximity of an opponent who cannot be attacked (Potegal 1991). The exposure of an experimental subject to a potential rival for a short time prior to the actual confrontation engenders intense levels of aggression, as originally described in mice (Lagerspetz and Hautojarvi 1967; Tellegen and Horn 1972). For example, male mice, rats, and hamsters initiate attacks with very short latency and at high frequency when tested with an intruder in their home cage or in an unfamiliar locale after having been provoked previously by an opponent (De Almeida and Miczek 2002; Fish et al. 1999; Potegal 1991). Instigation specifically increases aggressive behavior and does not activate locomotion, feeding, or sexual behavior (Lagerspetz and Hautojarvi 1967; Potegal and Tenbrink 1984; Potegal 1991). Even after removal of the instigating stimulus, high levels of aggression persist in fish and rodents, presumably from increased “aggressive arousal” or “attack readiness” (Potegal 1991). At the neurochemical level, male hamsters and rats that have been instigated to fight are characterized by a long-lasting decrease in serotonin in hypothalamus and in medial prefrontal cortex (Payne et al. 1984; van Erp and Miczek 2000). By contrast, behavioral and neurobiological information on escalated aggressive behavior by female animals is lacking.

The neural circuitry which is related to maternal aggressive behavior involves brain areas such as the periaqueductal gray matter, raphé nuclei, septal area, hypothalamic nuclei and ventral–orbital prefrontal cortex (De Almeida and Lucion 1997; Veiga et al. 2007; for review, see Lonstein and Gammie 2002), and several neurotransmitters are implicated in this type of behavior,

prominently serotonin (De Almeida and Lucion 1994, 1997). Brain serotonin also plays a critical role in many impulsive types of aggressive behavior and violence in humans and other species (Caspi et al. 2009; Coccaro 1989; Garattini et al. 1967; Giacalone et al. 1968; Maas 1962; Valzelli 1981). The treatment options of escalated aggression are compromised by the fact that there are no selective pharmacotherapies, most still relying on antipsychotic medications (Volavka 1995, 2002).

Systemic administration of selective 5-HT_{1A} receptor agonists such as 8-OH-DPAT, alnespirone, S-15535 (De Boer et al. 2000; De Boer and Koolhaas 2005), and some specific 5-HT_{1B} receptor agonists, such as CP-93,129 and CP-94,253 (De Almeida et al. 2006; Veiga et al. 2007; Bannai et al. 2007), exert efficacious and selective anti-aggressive activity, both on species-typical and on escalated aggression when microinjected into VO PFC or dorsal raphé nucleus (DRN). On the other hand, some 5-HT_{1A} receptor agonists, such as buspirone, flesinoxan, and ipsapirone, decrease aggressive behavior accompanied by undesirable side effects (De Almeida and Lucion 1994; Mos et al. 1992; Olivier et al. 1989a, b, 1990a, b, 1994). Escalated aggression and other types of aggressive behavior are effectively reduced by the stimulation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors (De Almeida and Miczek 2002; De Almeida et al. 2006; Fish et al. 1999; Olivier and van Oorschot 2005; Veiga et al. 2007). Highly selective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists do not significantly alter motor activities in the dose range that decreases aggressive behavior, both at species-typical (De Almeida and Lucion 1997; Joppa et al. 1997) and escalated levels (Centenaro et al. 2008; De Almeida and Miczek 2002; De Boer and Koolhaas 2005; Fish et al. 1999; Veiga et al. 2007). The specific role of these receptors was confirmed by reversal of the anti-aggressive effects using selective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} antagonists WAY-100,635 and SB-224,289 (Centenaro et al. 2008; De Almeida et al. 2006; De Boer et al. 1999, 2000; Lopez-Mendoza et al. 1998; Miczek et al. 1998).

5-HT_{1A} receptors are located on somata and dendrites in the DRN, where they act as inhibitory autoreceptors (Miquel et al. 1992). The 5-HT_{1A} receptors are also located postsynaptically in limbic areas acting as heteroreceptors on non-serotonergic neurons, where they inhibit the release of other neurotransmitters (Barnes and Sharp 1999). The 5-HT_{1B} receptors are located pre- and postsynaptically, the former act as autoreceptors on serotonergic terminals (Boschert et al. 1994; Bonaventura et al. 1998) and the latter are located as heteroreceptors. The prefrontal cortex is a brain region that contains both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors, specifically in the ventral–orbital region, and this area has been identified as a particularly important site in the inhibitory control of the sub-cortical circuits mediating

aggressive and impulsive behavior (Blair 2001, 2004; Séguin 2004; Cardinal et al. 2004; Kheramin et al. 2005; Veiga et al. 2007). Violent behavior is found in patients with lesions or neurodegenerative disorders in areas of the PFC, suggesting that this area is critical for the control of aggressive behavior (Hawkins and Trobst 1998, 2000; Davidson et al. 2000; Veit et al. 2002; Blair 2004; for review, see Brower and Price 2001).

Initially, we tested the hypothesis that 5-HT_{1B} receptors in serotonergic terminals are critical in the VO PFC for the control of escalated aggressive behavior in postpartum females. To this end, we examined the antiaggressive effects of the 5-HT_{1B} receptor agonist, CP-93,129, after this compound was microinjected into the VO PFC. A further test of this hypothesis was to confirm the specificity of 5-HT_{1B} receptor site as critical for decreasing aggressive behavior by microinjecting the 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-224,289 into the VO PFC. We expanded the hypothesis by integrating actions at terminal and somatodendritic receptors as sites of action for the behavioral effects of the receptor 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists, respectively, by microinjecting 8-OH-DPAT into the DRN and CP-93,129VO PFC at the same time. Finally, we sought to determine whether the anti-aggressive effects were the result of activation of pre- or postsynaptic receptors (5-HT_{1A} or 5-HT_{1B}).

Materials and methods

Animals

Nulliparous female Wistar rats ($N=114$), born and bred at *Universidade do Vale do Rio dos Sinos*, UNISINOS, 3–4 months old and weighing between 250 and 350 g, were maintained on a 12:12-h light:dark cycle, lights on at 4:00 am. After delivery, each litter was culled to eight pups. To test maternal aggressive behavior, the experimental female rats confronted male Wistar rats. Each male intruder was used only once per behavioral test. Females were kept in polycarbonate cages (65×55×25 cm). Intruders were male rats which had a direct confrontation with the residents ($n=60$) and weighed on average 50 g less than the females. The instigators were the animals that were protected and did not have a direct confrontation with the residents ($n=60$); they were also on average 50 g smaller than the resident females, and were maintained in groups of five, in standard polycarbonate cages (65×55×25 cm). The instigators were males that were never used as intruders. All of the rats were from the same strain, and all rats were kept in the same room in a temperature-controlled environment ($20\pm 2^\circ\text{C}$) with food and water available ad libitum.

Resident intruder confrontation

On the third postpartum day, females were selected for maternal aggressive behavior and only those displaying more than two bites against an unprotected intruder during a 10-min confrontation were used as subjects. About 30% of females were excluded because they did not meet this criterion. The behavioral test was conducted in the home cage of the female residents. From postpartum days 3 to 12, a high level of aggression is observed in females, and thereafter, aggressive behavior declines (Erskine et al. 1978; Mos and Olivier 1986).

Social instigation

On the fifth postpartum day, the social instigation procedure was implemented. The social instigation consisted of placing a clear perforated glass cylinder (28 cm long, 10 cm in diameter) containing an opponent male (“instigator”), for 5 min in the center of the female resident's home cage. The residents typically threatened the protected instigator and attacked the perforated glass cylinder. In general, rodents initiate attacks with very short latency and high frequency when tested with an intruder in their home cage after having been provoked previously by an opponent (Potegal 1991). The pups remained inside the cage together with their dams during the social instigation and the confrontation with the intruder.

Surgery

On the sixth postpartum day, each female was anesthetized with 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine intraperitoneally (IP), placed in a stereotaxic frame (David Kopf; Tujunga, CA, USA), and implanted with one or two guide cannulae (22 gauge) fixed with dental cement to the skull. One cannula was aimed at the VO PFC at the right hemisphere: 4.3 mm anterior to bregma, 0.6 mm lateral to the mid-sagittal line, 2.1 mm below dura mater. A second cannula was aimed at the DRN at the right hemisphere: -7.8 mm posterior to bregma, 1.6 mm lateral to the mid-sagittal line, 5.2 mm below dura mater, tilted in a 20° angle. The coordinates were based on the atlas by Paxinos and Watson (1998). Females remained separated from the pups for 2 h. Experiments were performed in accordance with the current NIH Guide for Animal Care and Use and *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA), and they were approved by the Research Committee of the University.

Microinjections

On the ninth postpartum day, the microinjections with agonist and antagonist or vehicle were performed 15 and 30 min

before the resident–intruder test, respectively (Veiga et al. 2007). The naive male intruder was placed into the female's cage, and immediately thereafter, the behaviors were videotaped for 10 min. The solutions were slowly infused over the course of 60 s at a rate of 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$, using a Hamilton syringe connected by tubing to the injecting needle that stayed in situ for a further minute after the microinjection.

Experimental groups:

- Experiment 1:** The animals were microinjected with CP-93,129 at 0.56 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$ ($n=12$) or vehicle (saline) ($n=9$) into the VO PFC 15 min before the confrontation with the intruder.
- Experiment 2** The females received two microinjections into the VO PFC. First, the animals were microinjected with 5-HT_{1B} receptor antagonist, SB-224,289 (5.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) and 15 min later with the 5-HT_{1B} receptor agonist, CP-93,129 (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) ($n=12$) or vehicle ($n=13$) or with vehicle plus vehicle ($n=12$).
- Experiment 3** The animals were microinjected with a 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT (0.56 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into DRN and with a 5-HT_{1B} receptor agonist, CP-93,129 (0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$, $n=9$) into VO PFC or vehicle and vehicle into DRN and into VO PFC. Both microinjections were performed immediately following each other. The control groups were microinjected with saline. In sequence, the rat was microinjected with 8-OH-DPAT immediately followed by CP-93,129. The behavioral tests occurred 15 min after the microinjections.

The groups studied were as follows:

- Vehicle into DRN + vehicle into VO PFC ($n=11$)
- Vehicle into DRN + CP-93,129 (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into VO PFC ($n=10$)
- 8-OH-DPAT (0.56 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into DRN + vehicle VO PFC ($n=9$)
- 8-OH-DPAT (0.56 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into DRN + CP-93,129 (0.1 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into VO PFC ($n=9$)
- 8-OH-DPAT (0.56 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into DRN + CP-93,129 (1.0 $\mu\text{g}/0.2 \mu\text{l}$) into VO PFRC ($n=9$)

Drugs

CP-93,129 (1,4-dihydro-3-[1,2,3,6-tetrahydro-4-pyridinyl]-SH-pyrrolo [3,2-b] pyridine-5-one dihydrochloride; Pfizer, Groton, CT, USA), and 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin hydrobromide; Sigma, St. Louis, MO, USA) were dissolved and sonicated in saline solution. The 5-HT_{1B} receptor agonist, CP-93,129 was donated by Pfizer.

Histology

After completion of all behavioral tests, the dams were deeply anesthetized with an overdose of sodium thiopental. Brains were perfused with saline and thereafter with 4% formaldehyde. The brains were removed and fixed in 4% formaldehyde and later cut on a vibratome in 50-micron coronal slices. Locations of the cannula tips were determined via microscopic analysis, and only the animals with an exact localization were used for data analysis (Fig. 1). The animals that were designated as anatomical controls had incorrectly positioned placements. Histological analysis showed that 66 cannula placements were correctly positioned in the target areas in experiments 1 and 2 (Fig. 2), and 48 cannula placements were correctly positioned in the target areas in experiment 3 (Fig. 3). Five animals were anatomical controls in experiment 1 (Fig. 2a), seven in experiment 2 (Fig. 2b), and eight in experiment 3 (Fig. 3a, b).

Behavioral analysis

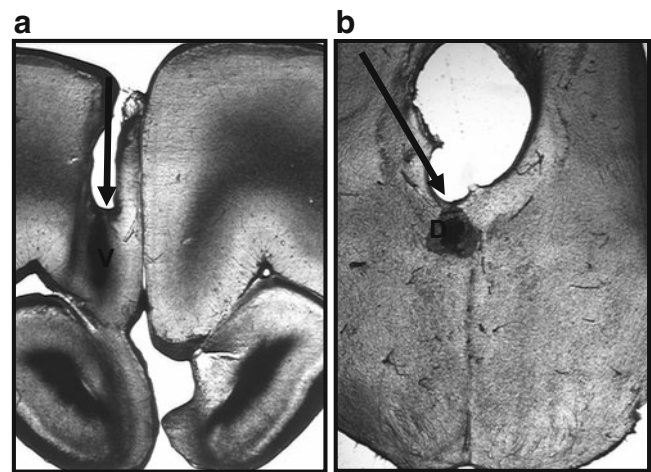
The resident–intruder confrontations were videotaped and later analyzed by a trained investigator with adequate inter- and intra-observer reliability using The Observer software (version 3.0, Noldus, The Netherlands). De Almeida and Lucion (1997) previously defined the behavioral repertoire of lactating females, including the frequency and duration of aggressive elements such as lateral threat, lateral attack, bite, and pin, and the duration of non-aggressive elements such as sniffing the intruder, grooming, rearing, and walking. Pup care measurements included how long each dam carried, licked, and nursed the pups.

Statistical analysis

After confirming the homogeneity of variance of all data, they were expressed as mean \pm SEM. The effect of social instigation on maternal aggressive behavior was analyzed using a paired Student *t* test, comparing species-typical baseline aggression vs aggression after social instigation.

Data from all three experiments were analyzed using one-way ANOVAs. When a statistically significant *F* value ($p<0.05$) was obtained, Newman–Keuls post hoc tests were conducted comparing drug treatments with the corresponding vehicle group. Regarding non-aggressive motor behaviors, the data from all groups with agonist and antagonist treatment were compared with those from their respective controls using ANOVA. When significant differences were found, Newman–Keuls post hoc tests were performed. The data from the anatomical control animals were compared to those from the vehicle group using a paired Student *t* test.

Fig. 1 **a** Photomicrograph showing the placement of the guide cannula and injection in the VO PFC. **b** Photomicrograph showing the placement of guide cannula and injection into DRN (arrow)



Results

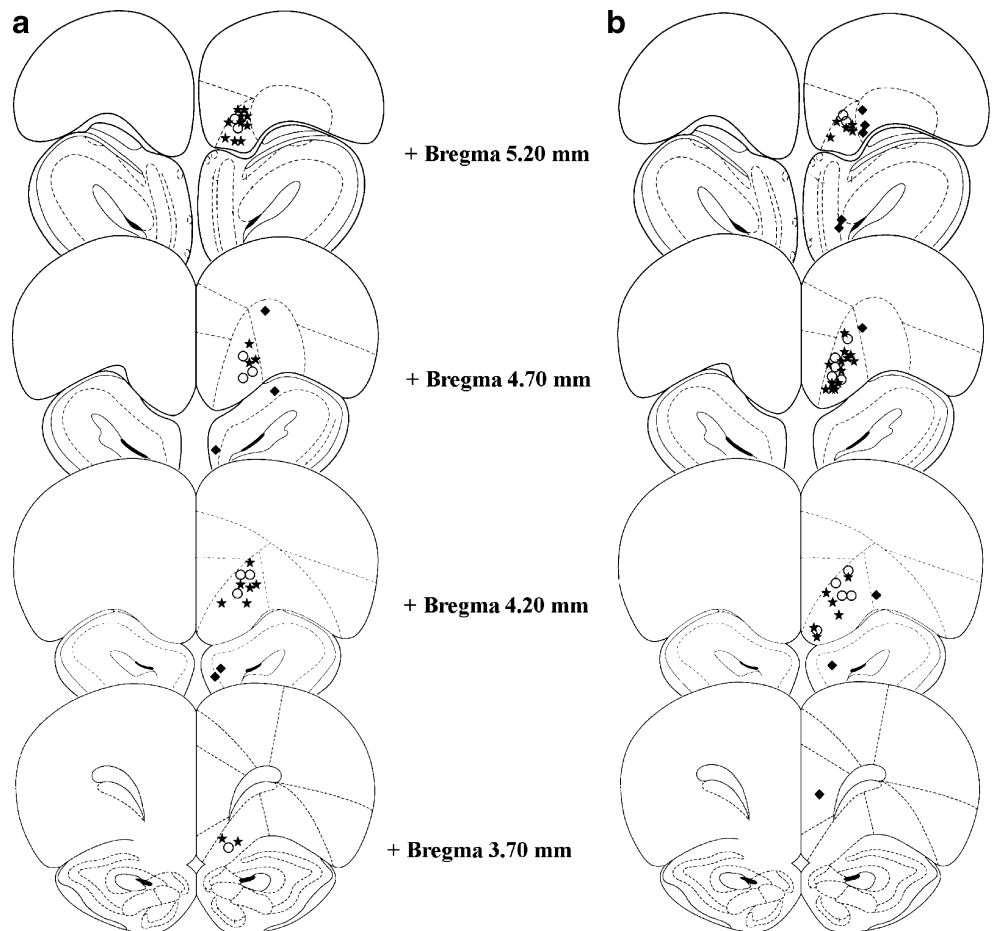
Heightened aggression after social instigation

Social instigation significantly increased bite frequency in postpartum female rats compared to a non-instigated control group ($t(104)=2.87$; $p<0.004$; Fig. 4).

Aggressive behaviors

In experiment 1, CP-93,129 (1.0 μg) microinjected into VO PFC of instigated females decreased the frequency of lateral attack ($F(5,77)=4.78$; $p<0.008$; Table 1), lateral threat ($F(3,33)=3.62$; $p<0.05$; Table 1), and pinning the intruder ($F(5,16)=3.98$; $p<0.01$; Table 1) as compared to the control

Fig. 2 **a, b** Schematic representation of successive coronal sections of the rat brain showing the histological verification of injection placement ($n=66$) in the ventral–orbital prefrontal cortex (rostral to caudal: 5.20, 4.70, 4.20, and 3.70 mm anterior to the bregma). VO ventral–orbital frontal cortex, LO lateral orbital cortex, MO medial orbital cortex, Cg3 cingulate cortex, area 3, Fr2 frontal cortex, area 2, AI agranular insular cortex, VLO ventrolateral orbital cortex. All the images are from Paxinos and Watson (1998). **a** Experiment 1: Asterisks represent the site of CP-93,129 injection and pen circles represent the site of vehicle injection. **b** Experiment 2: Asterisks represent the site of SB-224,289 injection and pen circles represent the site of vehicle injection. Diamonds represent off-target injections for CP-93,129, vehicle, or SB-224,289 injections



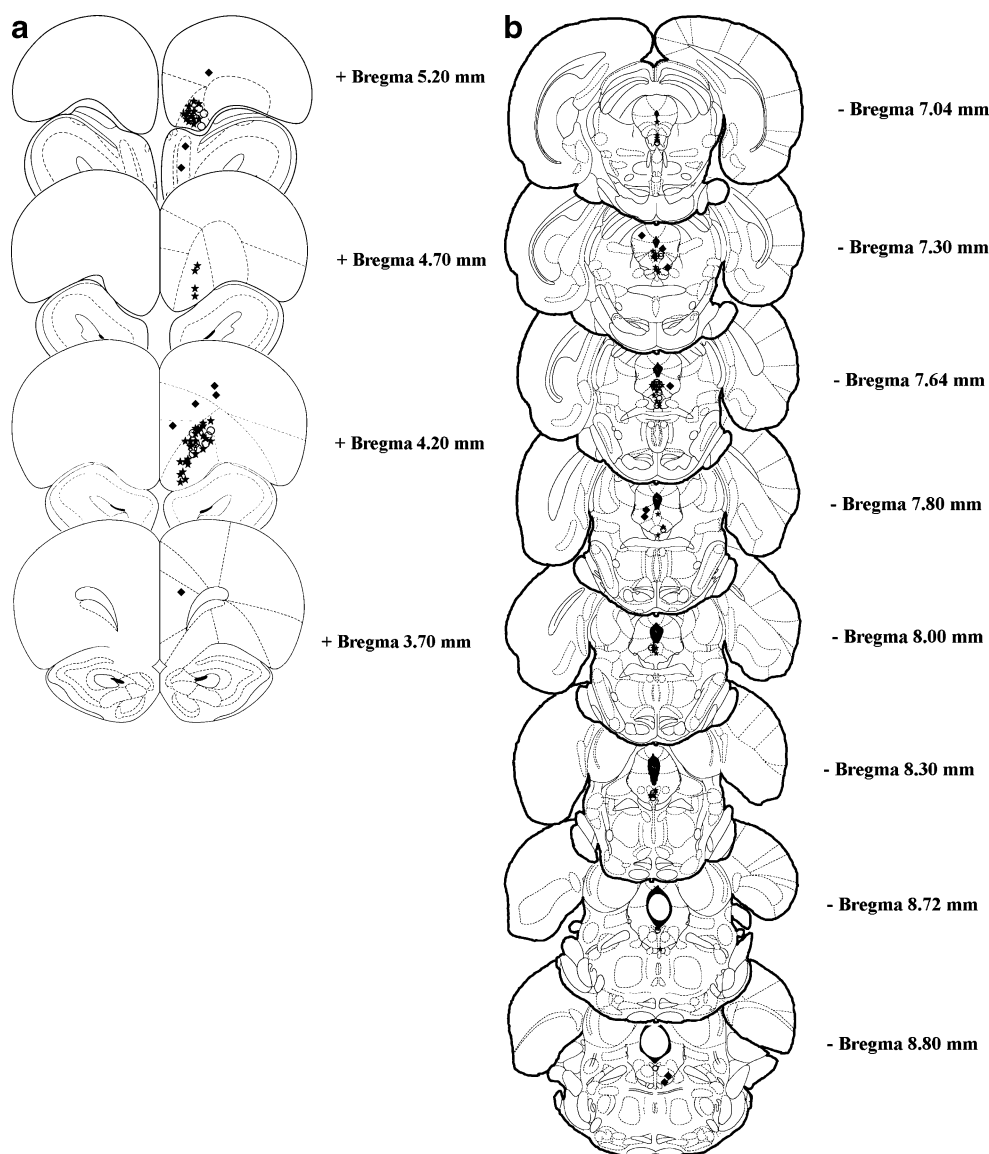


Fig. 3 Experiment 3. **a** Schematic representation of successive coronal sections of the rat brain showing the histological verification of injection placement ($n=48$) in the ventral–orbital frontal cortex (rostral to caudal: 5.20, 4.70, 4.20, and 3.70 mm anterior to the bregma). *VO* ventral–orbital frontal cortex, *LO* lateral orbital cortex, *MO* medial orbital cortex, *Cg3* cingulate cortex, area 3, *Fr2* frontal cortex, area 2, *AI* agranular insular cortex, *VLO* ventrolateral orbital cortex. *Asterisks* represent the site of CP-93,129 injection and *pen circles* represent the site of vehicle injection. **b** Schematic representation of successive coronal sections of the rat brain showing the histological verification of

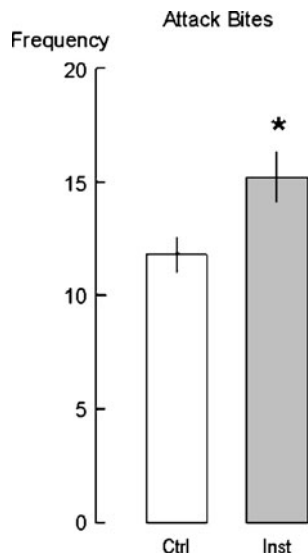
injection placement ($n=48$) in the dorsal raphe nucleus (rostral to caudal: -7.04, -7.30, -7.64, -7.80, -8.00, -8.30, -8.72, and -8.80 mm posterior to the bregma). *CG* central gray, *3PC* oculomotor nucleus parvocellular, *Su3* supraoculomotor central gray, *mIf* medial longitudinal fasciculus, *CLi* caudal linear nucleus raphe, *CGLV* central gray, lateral ventral, *CGM* central gray medial, *Me5* mesencephalic trigeminal nucleus. *Asterisks* represent the site of 8-OH-DPAT injection and *pen circles* represent the site of vehicle injection. *Diamonds* represent no target of CP-93,129, vehicle or 8-OH-DPAT injections. All the images are from Paxinos and Watson (1998)

group. The 1.0 μg dose decreased the frequency of lateral attack as compared to 0.56 μg ($F(5,77)=3.03$; $p<0.08$; Table 1). The lower dose of CP-93,129 (0.56 μg) decreased only the frequency of pinning the intruder ($F(5,16)=3.93$; $p<0.01$; Table 1) as compared to the control group. The duration (in seconds) of lateral attack ($F(5,95)=4.86$; $p<0.007$; Table 1), lateral threat ($F(3,34)=3.65$; $p<0.05$; Table 1), and pinning the intruder ($F(4,66)=4.07$; $p<0.01$; Table 1) decreased when CP-93,129 (1.0 μg) was microinjected into

VO PFC, as compared to the control group. The lower dose of CP-93,129 (0.56 μg) decreased the duration of pinning the intruder ($F(4,66)=3.34$; $p<0.01$; Table 1) as compared to the control group. When CP-93,129 was microinjected at the 1.0 μg dose outside of the VO PFC, it did not alter any of the aggressive behaviors (Table 1).

In experiment 2, the pretreatment with the 5-HT_{1B} receptor antagonist, SB-224,289, at the 5.0 μg dose antagonized the decrease of frequency of lateral threat and

Fig. 4 The effects of instigation (*Inst*) by an intruder on maternal aggressive behavior in resident female rats ($N=105$ in each group). The aggressive behavior portrayed is the frequency of attack bites towards the male intruder under control (*Ctrl*) and instigation (*Inst*) conditions. Vertical bars represent the mean \pm SEM. Asterisk, $p \leq 0.004$



pinning the intruder produced by CP-93,129 (Table 1). The frequency of lateral attacks was not altered as compared to control group (Table 1). There were no significant effects on aggressive behaviors after the microinjections of vehicle and SB-224,289 into VO PFC (Table 1). The duration (in seconds) of lateral threat and pinning the intruder produced by CP-93,129 too was antagonized after the pretreatment with the 5-HT_{1B} receptor antagonist, SB-224,289 at the 5.0- μ g dose (Table 1). The duration of lateral attacks was not altered as compared to control group (Table 1).

In experiment 3, microinjections of 8-OH-DPAT at the 0.56 μ g dose into the DRN followed by vehicle into VO PFC significantly increased the frequency ($F(3,45)=4.13$; $p < 0.01$, Fig. 5a) and the duration ($F(3,48)=4.06$; $p < 0.01$, Fig. 5a) of lateral attacks as compared to the vehicle group. Microinjections of 8-OH-DPAT into DRN (0.56 μ g) followed by vehicle into the VO PFC also increased the frequency ($F(3,34)=3.50$; $p < 0.01$, Fig. 5b) and the duration ($F(3,32)=3.56$; $p < 0.01$, Fig. 5a) of bites directed at the

Table 1 Behaviors during aggression in postpartum female rats

Parameter	CP-93,129 doses (μ g/0.2 μ l)				Vehicle +Vehicle ($n=12$)	SB-224,289 (5.0 μ g/0.2 μ l)		Ac ($n=7$)
	Vehicle ($n=9$)	0.56 ($n=12$)	1.0 ($n=8$)	Ac ($n=5$)		+Vehicle ($n=13$)	+CP-93,129 ($n=12$)	
Latency to attack	28.0 \pm 7.4	76.4 \pm 11.1 ^b	21.5 \pm 12.2 ^a	52.3 \pm 9.6	86.0 \pm 21.0	64.7 \pm 21.3	68.6 \pm 31.5	44.6 \pm 18.7
Frequency								
Lateral attack	12.0 \pm 2.4	8.3 \pm 1.5	2.7 \pm 1.1 ^c	9.8 \pm 3.6	8.5 \pm 1.3	5.5 \pm 1.0	10.2 \pm 1.8	10.0 \pm 4.9
Bite the body	4.6 \pm 2.1	3.5 \pm 1.1	2.0 \pm 1.1	5.6 \pm 4.2	1.4 \pm 0.8	2.1 \pm 0.8	2.0 \pm 0.6	3.1 \pm 2.0
Lateral threat	6.1 \pm 1.7	4.2 \pm 1.2	0.9 \pm 0.5 ^d	6.4 \pm 2.9	1.2 \pm 0.4	2.2 \pm 0.7	2.8 \pm 0.8	5.0 \pm 3.4
Pin	4.6 \pm 1.1	1.4 \pm 0.9 ^d	0.1 \pm 0.1 ^d	2.2 \pm 1.5	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4
Duration aggressive behaviors								
Lateral attack	9.30 \pm 1.98	5.35 \pm 1.27	1.76 \pm 0.7 ^d	7.84 \pm 3.21	6.17 \pm 1.34	4.04 \pm 0.86	7.49 \pm 1.65	7.77 \pm 4.11
Bite the body	3.82 \pm 1.81	2.19 \pm 0.75	1.87 \pm 0.93	6.24 \pm 5.57	0.81 \pm 0.46	1.26 \pm 0.53	1.05 \pm 0.35	3.50 \pm 2.51
Lateral threat	10.02 \pm 2.83	6.06 \pm 2.24	1.21 \pm 0.81 ^d	18.42 \pm 8.35	2.60 \pm 1.03	3.36 \pm 1.33	4.55 \pm 1.53	9.68 \pm 7.31
Pin	20.71 \pm 7.02	5.89 \pm 3.56	0.81 \pm 0.81 ^c	9.50 \pm 5.85	0.80 \pm 0.80	0.32 \pm 0.24	4.27 \pm 2.61	1.80 \pm 0.90
Duration non aggressive behaviors								
Sniffing	170.4 \pm 30.6	160.2 \pm 13.8	84.2 \pm 20.7 ^c	246.3 \pm 35.6	194.2 \pm 17.8	185.1 \pm 17.3	203.2 \pm 28.8	214.6 \pm 35.3
Pup care	6.9 \pm 4.0	1.4 \pm 0.8	16.3 \pm 10.5	4.1 \pm 1.9	1.7 \pm 0.9	1.9 \pm 1.4	1.8 \pm 1.4	2.6 \pm 1.3
Walking	98.4 \pm 14.5	138.6 \pm 17.5	91.6 \pm 12.3	95.9 \pm 10.1	85.0 \pm 13.9	113.3 \pm 9.8	135.3 \pm 8.9 ^f	107.6 \pm 16.3
Rearing	11.5 \pm 5.5	21.0 \pm 3.6	43.4 \pm 14.0 ^d	19.62 \pm 4.0	11.1 \pm 3.0	29.4 \pm 6.8 ^g	12.6 \pm 2.3	6.9 \pm 2.3
Grooming	53.3 \pm 13.0	69.9 \pm 14.2	37.2 \pm 10.8	59.1 \pm 20.6	44.0 \pm 14.7	59.5 \pm 12.2	43.4 \pm 8.0	56.2 \pm 15.0

Data expressed in mean \pm SEM

Ac anatomical controls

^a $p < 0.01$, compared to 0.56 group

^b $p < 0.01$, compared to vehicle group

^c $p < 0.05$, compared to vehicle and 0.56 groups

^d $p < 0.05$, compared to vehicle group

^e $p < 0.05$, compared to veh + veh and SB + vehicle group

^f $p < 0.01$, compared to veh + veh group

^g $p < 0.01$, compared to veh + veh and SB + CP group

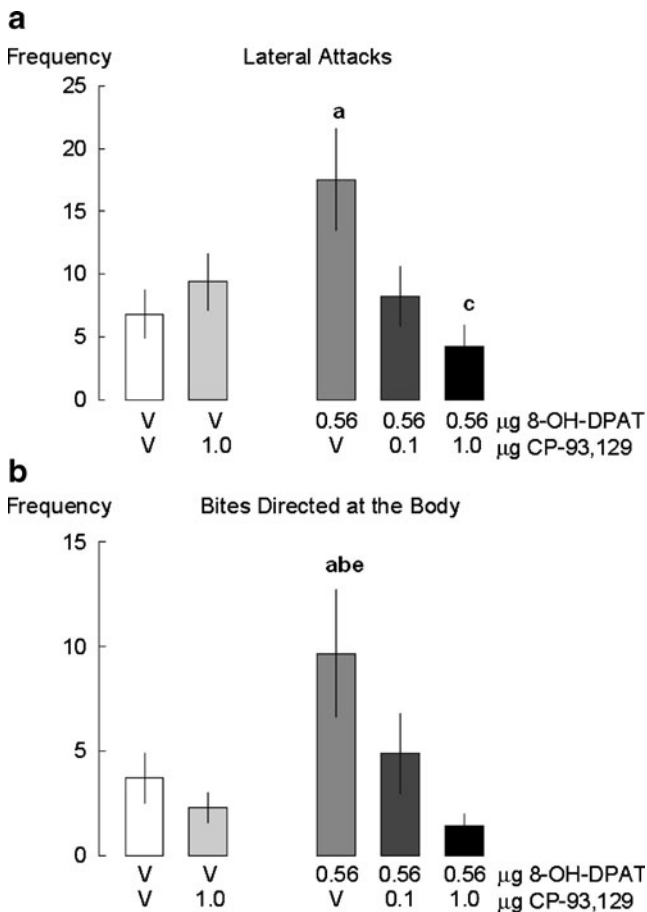


Fig. 5 Effects of 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT in the dorsal raphe nucleus and of 5-HT_{1B} receptor agonist CP-93,129 in the VO PFC on escalated aggressive behavior. **a** Frequency of lateral attacks. **a** $p \leq 0.05$ compared to Veh + Veh; **c** $p \leq 0.05$ compared to 8-OH + Veh. **b** Frequency of bites, directed at the body of the intruder after vehicle microinjection followed immediately by a second vehicle, vehicle followed immediately by CP-93,129 (1.0 μg/0.2 μl), 8-OH-DPAT (0.56 μg/0.2 μl), followed immediately by vehicle, 8-OH-DPAT (0.56 μg/0.2 μl) followed immediately by CP-93,129 (0.1/0.2 μl), and 8-OH-DPAT (0.56 μg/0.2 μl) followed immediately by CP-93,129 (1.0 μg/0.2 μl), respectively. **abe** $p \leq 0.05$ compared to Veh + Veh; Veh + CP 1.0 and 8-OH+CP 1.0. Vertical bars represent the mean ± SEM

intruder's body as compared to vehicle group. By contrast, microinjections of 8-OH-DPAT into the DRN (0.56 μg) followed by CP-93,129 (1.0 μg) into VO PFC decreased the frequency ($F(3,45)=4.89$; $p < 0.01$; Fig. 5a, b) and the duration ($F(3,48)=4.97$; $p < 0.01$, Fig. 5a, b) of lateral attacks and also decreased the frequency ($F(3,34)=4.63$; $p < 0.01$; Fig. 5a, b) and the duration ($F(3,32)=4.58$; $p < 0.01$, Fig. 5a) of bites directed at the intruder's body as compared to 8-OH-DPAT (0.56 μg) + vehicle. The frequency and the duration of lateral threats was not changed in any of the groups after microinjections of 8-OH-DPAT + vehicle or 8-OH-DPAT (0.56 μg) + CP-93,129 (0.1 μg) or 8-OH-DPAT (0.56 μg) + CP-93,129 (1.0 μg) (see Table 2).

Non-aggressive behaviors

In experiment 1, microinjection of 1.0 μg CP-93,129 into VO PFC significantly decreased the duration of sniffing the intruder and the duration of rearing when compared to the control group. The other behaviors, such as interacting with pups, walking, and grooming, were not altered by any dose of CP-93,129 (Table 1).

In experiment 2, only the duration of rearing was decreased after the microinjection of SB-224,289 plus vehicle as compared to this measure in the control group (Table 1). The treatment with SB-224,289 + CP-93,129 changed the duration of non-aggressive behaviors such as walking and rearing as compared to SB-224,289 + vehicle. All the other non-aggressive behaviors remained unchanged as compared to the measures in the control group (Table 1).

In experiment 3, none of the non-aggressive behaviors, such as walking, rearing, and grooming, were changed by the microinjections of 8-OH-DPAT into the DRN and CP-93,129 into the VO PFC (Table 2).

Discussion

The current experiments provide evidence that stimulation of the 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors in the DRN via the agonist 8-OH-DPAT significantly increases aggressive behavior by postpartum females, while activation of 5-HT_{1B} receptors in the VO PFC has anti-aggressive effects. The current study is the first to demonstrate increased aggressive behavior in postpartum females with microinjection of 8-OH-DPAT in the DRN after social instigation. Moreover, this appears to be the first evidence for functionally opposing roles of receptor subtypes within the 5-HT₁ family, at least with regard to aggressive behavior by postpartum females.

Contrary to the aggression-escalating effects in the present experiments after 8-OH-DPAT microinjection into the DRN, 8-OH-DPAT and alnespirone microinjections into the DRN diminished aggressive behavior in male rats (Mos et al. 1993). De Almeida and Lucion (1997) microinjected 8-OH-DPAT (0.2 and 2.0 μg) directly into the median raphe nucleus and found a decrease in aggression during the postpartum period of female Wistar rats. By contrast, microinjection of 8-OH-DPAT (0.2–2.0 μg) into the medial septal area increased postpartum aggressive behavior (De Almeida and Lucion 1997).

8-OH-DPAT increased important elements of aggressive behavior by postpartum females due to action on serotonergic neurons in the DRN; it causes an auto-inhibition via action on the 5-HT_{1A} autoreceptors (Sprouse and Aghajanian 1987). The activation of 5-HT_{1A} receptors by 5-HT leads to an opening of potassium channels causing a hyperpolarization

Table 2 Behaviors during aggression in postpartum female rats

Parameter	Vehicle		8-OH [0.56]			Ac (n=8)
	+ Vehicle (n=11)	+ CP-93 [1.0] (n=10)	+ Vehicle (n=9)	+ CP-93 [0.1] (n=9)	+ CP-93 [1.0] (n=9)	
Latency to attack	97.8±40.3	48.0±14.9	52.0±13.0	71.4±29.4	47.1±26.0	26.4±12.5
Frequency						
Lateral attack	6.8±2.0	9.4±2.3	17.5±4.1 ^b	8.2±2.4	4.2±1.8 ^a	11.6±3.8
Bite the body	3.7±1.2	2.3±0.7 ^a	9.6±3.0 ^b	4.8±1.9	1.4±0.6 ^a	10.5±4.1
Lateral threat	1.4±0.8	1.2±1.0	2.5±1.4	1.6±1.1	1.5±0.8	1.5±1.2
Duration aggressive behaviors						
Lateral attack	5.01±1.61	7.47±2.05	14.14±3.90 ^b	6.45±2.04	2.42±1.09 ^c	9.12±3.28
Bite the body	2.66±0.99	1.54±0.57 ^a	7.46±2.59 ^b	3.46±1.37	0.97±0.44 ^a	8.25±3.57
Lateral threat	1.31±0.87	1.51±1.40	4.96±3.21	2.38±1.88	5.86±4.05	1.50±1.23
Duration non aggressive behaviors						
Walking	103.4±12.4	91.3±14.4	87.8±15.0	132.0±30.5	139.6±21.9	102.1±24.0
Sniffing	199.8±17.8	212.4±27.2	238.0±21.4	180.7±21.9	172.7±28.0	155.8±29.3
Pup care	20.9±14.0	3.2±1.9	30.5±28.3	29.9±29.5	8.3±6.3	97.7±50.0
Rearing	16.0±4.6	4.5±1.1	15.6±4.2	13.2±6.4	16.5±6.9	8.4±2.7
Grooming	53.1±13.1	77.4±8.8	57.4±13.6	84.4±20.3	49.5±9.7	52.3±19.1

Data expressed in mean ± SEM

Ac anatomical controls

^a $p < 0.05$, compared to 8-OH + Veh group

^b $p < 0.05$, compared to Veh + Veh group

^c $p < 0.01$, compared to 8-OH + Veh group

(Sprouse and Aghajanian 1987) and inhibition of the impulse flow in serotonergic cells (Sinton and Fallon 1988; Sprouse and Aghajanian 1986, 1987; Vandermaelen et al. 1986) and the release of 5-HT in terminal areas (Adell et al. 1993; Bosker et al. 1994; Casanovas et al. 1997; Kreiss and Lucki 1994; Sharp et al. 1989), including the prefrontal cortex. In particular, 5-HT_{1A} autoreceptors on DRN show an important role in the physiologic control by ascending serotonergic pathways, attenuation of the excessive activation from 5-HT neurons by excitatory afferences from various structures in the brainstem (Descarries et al. 1982; Jacobs and Azmitia 1992; Baumgarten and Grozdanovic 1997; Ferreira and Menescal-de-Oliveira 2009). Using the current microinjection technique, it is likely that, with the 8-OH-DPAT-induced diminished impulse flow of serotonin to the prefrontal cortex, CP-93,129 diminished aggressive behavior by acting primarily presynaptically.

By contrast, CP-93,129 reduced the offensive elements of maternal aggressive behavior such as the frequency of lateral attacks and the number of bites directed toward the intruder's body (Haney et al. 1989), as well as the duration of lateral attacks and bites (Table 1). On the other hand, no changes were detected in the defensive nature of the female's response, most prominently quick frontal attacks, which have been interpreted most often in terms of a fear or

anxiety response towards the intruder (De Almeida and Lucion 1997; Neumann et al. 2010). Our previous studies have also demonstrated that CP-93,129 primarily modifies the offensive elements of maternal aggression (Veiga et al. 2007). The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-93,129 reduced maternal aggressive behavior at the highest dose (1.0 µg), and even at the lower 0.1-µg dose had a tendency to decrease the maternal aggressive behavior when microinjected into the VO PFC. The two vehicle microinjections plus CP-93,123 did not have the same effects on the socially instigated lactating females, which also received two instead of one microinjection. All animals received two injections, a potentially more stressful procedure. Interference with aggressive behavior due to this more stressful procedure is another possibility to explain the differential outcomes in the studies from Veiga et al. (2007) and the present one (see De Castilhos et al. 2006; Padovan and Guimarães 2004). Also, seasonal and between-group variability could have accounted for this difference since the two experiments were performed several months apart, confirming earlier observations (Padovan and Guimarães 2004). This anti-aggressive effect was particularly evident in the experimental group that showed very high levels of aggressive behavior after microinjection of 8-OH-DPAT (0.56 µg) in the DRN followed immediately by the

microinjection of CP-93,129 (1.0 μg) into the VO PFC, and as detected by the duration of lateral attacks and bites of the intruder's body (Table 2). However, a significant decrease in aggression was evident in the group microinjected with vehicle followed by CP-93,129 (1.0 μg) into VO PFC. This decrease was significant for the measures of lateral attacks, attack bites, and lateral threats. The non-aggressive behaviors such as locomotion and social investigation were not altered, providing further evidence for the behavioral specificity of the role of 5-HT_{1B} receptors in the modulation of maternal aggressive behavior. CP-93,129 and SB-224,289 are compounds with high affinity for the 5-HT_{1B} receptor ($\text{pK}_i=8.1$ and $\text{pK}_i=8.2$, respectively), when compared with other subtypes of the 5-HT₁ receptor family (Centenaro et al. 2008; Roberts et al. 2001). Systemic or intracerebral administration (Bannai et al. 2007; Centenaro et al. 2008; De Boer and Koolhaas 2005) of CP-93,129 have been shown to exert potent anti-aggressive effects, without modifying other types of non-aggressive behavior.

The relatively few studies on neural mechanisms mediating maternal aggressive behavior (Consiglio et al. 2005; De Almeida and Lucion 1997; Factor et al. 1993; Ferreira et al. 1987; Hansen and Ferreira 1986; Giovenardi et al. 1998; Insel 1986; Lonstein and Gammie 2002; Nelson and Trainor 2007; Russel and Leng 1998; Svare 1990) implicate the mediodorsal region of the thalamus, peripeduncular nucleus of the lateral midbrain (PPN), septum, paraventricular and medial hypothalamus, and amygdala. The defensive nature of the postpartum female's response, most prominently frontal attacks, has been interpreted most often in terms of a fear or anxiety response towards the intruder. Previously, we showed that the 5-HT_{1B} receptors in the VO PFC have an important role in maternal aggressive behavior (Veiga et al. 2007).

The respective roles of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in modulating aggressive behavior remain a source of debate and conflicting evidence (De Almeida and Lucion 1997; Millan et al. 1997; Mos et al. 1993; Sanchez and Hyttel 1994; Sijbesma et al. 1991). Consistent with the present results, there is evidence that the anti-aggressive effects of 5-HT_{1A} receptor stimulation are caused via activation of the 5-HT postsynaptic receptors (Sijbesma et al. 1991; Mos et al. 1992, 1993; Olivier and van Oorschot 2005). Microinjections of CP-93,129 or CP-94,253 into the DRN exert potent anti-aggressive effects, which can be obtained by action at multiple sites, somatodendritic autoreceptors, presynaptic terminal autoreceptors, and postsynaptic heteroreceptors (Bannai et al. 2007; Faccidomo et al. submitted). Studies with 5-HT_{1B} full and partial receptor agonists such as CP-94,253, eltoprazine, TFMPP, zolmitriptan, and anpirtoline have consistently shown anti-aggressive effects, regardless of the basal levels of aggressive behavior (De Almeida and Miczek 2002; Miczek et al. 2002; Mos et al. 1992; Olivier

and Mos 1986), which can be mediated by somatodendritic autoreceptors (Bannai et al. 2007, Faccidomo et al. submitted) or postsynaptic heteroreceptors (De Almeida et al. 2001).

However, some studies emphasize 5-HT_{1A} autoreceptors as the relevant site for the antiaggressive effects of BMY-7378 (White et al. 1991), NAN-190 (Sanchez et al. 1996), and, particularly, S-15535 (De Boer and Koolhaas 2005; Millan et al. 1997). Other studies have shown that maternal aggressive behavior in rats was decreased after systemic administration of 5-HT_{1A} receptor agonists such as ipsapirone, 8-OH-DPAT, fluprazine, and buspirone and by DOI, α 5-HT_{2A/C} receptor agonist (Ferreira et al. 2000; Lonstein and Gammie 2002; Olivier et al. 1985, 1986, 1995), and by the SSRI fluvoxamine (Lonstein and Gammie 2002).

In summary, CP-93,129, when microinjected into the region of the VO PFC of postpartum female rats that were provoked socially, acting either on presynaptic terminal 5-HT_{1B} autoreceptors or on postsynaptic heteroreceptors, reduced aggressive behavior. On the other hand, the activation of the somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors via the local microinjection of 8-OH-DPAT into the DRN increased aggressive behavior in postpartum female rats. It is possible that 5HT_{1B} receptors in VO PFC participate in enhancing maternal responsivity, including maternal aggression and pup care, rather than aggression itself. On the other hand, the defensive nature of the female's response, most prominently frontal attacks, may involve fear or anxiety responses towards the intruder, contrasting with pup care (Table 1).

Further experiments are necessary to assess the role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists in the DRN and in the VO PFC, respectively in male aggression to assess potential sex differences in rodents and primate species. As complement to the current neuropharmacological studies of the VO PFC and the DRN, we are currently assessing the activation of neurons in these areas as indicated by c-Fos during an aggressive confrontation in female rats (Veiga et al. in preparation). Furthermore, it is important to learn to what extent social instigation induces genomic and non-genomic changes in 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor expression.

References

- Adell A, Carceller A, Artigas F (1993) In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* 60:1673–1681
- Bannai M, Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA (2007) Antiaggressive effects of agonists at 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus of mice. *Psychopharmacology* 193:295–304
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152

- Baumgarten HG, Grozdanovic Z (1997) Anatomy of central serotonergic projection systems. In: Baumgarten HG, Gothert M (eds) Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS. Springer, Berlin, pp 41–71
- Blair RJ (2001) Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:727–731
- Blair JR (2004) The roles of orbital frontal cortex in the modulation of antisocial behavior. *Brain Cogn* 55:198–208
- Bonaventura P, Voorn P, Luyten WHML, Jurzak M, Schotte A, Leyten JE (1998) Detailed mapping of serotonin 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor messenger RNA and ligand binding sites in guinea pig brain and trigeminal ganglion: clues for function. *Neuroscience* 82:469–484
- Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R (1994) Then mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience* 58:167–182
- Bosker F, Klompmaekers A, Westenberg H (1994) Extracellular 5-hydroxytryptamine in median raphe nucleus of the conscious rat is decreased by nanomolar concentrations of 8-hydroxy-2-(Di-n-Propylamino) tetralin and is sensitive to tetrodotoxin. *J Neurochem* 63:2165–2171
- Brower MC, Price BH (2001) Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:720–726
- Cardinal RM, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 1021:33–50
- Casanovas JM, Lésourd M, Artigas F (1997) The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. *Br J Pharmacol* 122:733–741
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R (2009) Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 297:851–854
- Centenaro LA, Vieira K, Zimmermann N, Miczek KA, Lucion AB, De Almeida RMM (2008) Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 201:237–248
- Coccaro EF (1989) Central serotonin and impulsiv aggression. *Br J Psychiatry* 52–62
- Consiglio AR, Bridges RS (2009) Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behav Brain Res* 197:97–102
- Consiglio AR, Borsoi A, Pereira G, Lucion AB (2005) Effects of oxytocin microinjected into different areas of the central nervous system on maternal aggressive behavior. *Physiol Behav* 85:354–362
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson C (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation - a possible prelude to violence. *Science* 289:591–594
- De Almeida RMM, Lucion AB (1994) Effects of intracerebroventricular administration of 5-HT receptor agonists on the maternal aggression of rats. *Eur J Pharmacol* 264:445–448
- De Almeida RMM, Lucion AB (1997) 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomedia amygdala nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134:392–400
- De Almeida RMM, Miczek KA (2002) Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement (“frustration”) in mice: inhibition by anpirtoline – a 5-HT_{1B} receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 27:171–181
- De Almeida RMM, Faccidomo S, Fish E, Miczek KA (2001) Inhibition of alcohol-heightened aggression by action at post-synaptic 5-HT_{1B} receptors in male mice. *Aggress Behav* 3:234–235
- De Almeida RMM, Santos DM, Saft DM, Benini Q, Miczek KA (2006) 5-HT_{1B} receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice. *Psychopharmacology* 185:441–450
- De Boer SF, Koolhaas JM (2005) 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol* 523:125–139
- De Boer SF, Lesourd M, Mocaer E, Koolhaas JM (1999) Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident–intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors: a comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1125–1133
- De Boer SF, Lesourd M, Mocaer E, Koolhaas JM (2000) Somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors mediate the anti-aggressive actions of 5-HT_{1A} receptors agonist in rats: an ethopharmacological Psychopharmacology study with S-15535, alnespirone, and WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* 23:20–33
- De Castilhos J, Marcuzzo S, Forti CD, Frey R, Stein D, Achaval M, Rasia-Filho AA (2006) Further studies on the rat posterodorsal medial amygdala: dendritic spine density and effect of 8-OH-DPAT microinjection on male sexual behavior. *Brain Res Bull* 69:131–139
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* 3:239–254
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1978) Intra-specific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 23:206–218
- Factor EM, Mayer AD, Rosenblatt JS (1993) Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behav Neurosci* 107:166–185
- Ferreira MD, Menescal-de-Oliveira L (2009) Role of dorsal raphe nucleus 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. *Brain Res* 1285:69–76
- Ferreira A, Dahlof LG, Hansen S (1987) Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 101:709–717, see also p. 746
- Ferreira A, Picazo O, Uriarte N, Pereira M, Fernandez-Guasti A (2000) Inhibitory effect of buspirone and diazepam, but not of 8-OH-DPAT, on maternal behavior and aggression. *Pharmacol Biochem Behav* 66:389–396
- Fish EW, Faccidomo S, Miczek KA (1999) Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94, 253. *Psychopharmacology* 146:391–399
- Garattini S, Giacalone E, Valzelli L (1967) Isolation, aggressiveness and brain 5-hydroxytryptamine turnover. *J Pharm Pharmacol* 19:338–339
- Giacalone E, Tansella M, Valzelli L, Garattini S (1968) Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice. *Biochem Pharmacol* 17:1315–1327
- Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB (1998) Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav* 63:351–359
- Haney M, De Bold JF, Miczek KA (1989) Maternal aggression in mice and rats toward male and female conspecifics. *Aggress Behav* 15:443–453
- Hansen S, Ferreira A (1986) Effects of bicuculline infusions in the ventromedial hypothalamus and amygdaloid complex on food intake and affective behavior in mother rats. *Behav Neurosci* 100:410–415

- Hawkins KA, Trobst KK (1998) Frontal lobe dysfunction and aggression: conceptual issues and research findings. *Aggression Violent Behav* 5:147–157
- Hawkins KA, Trobst KK (2000) Frontal lobe dysfunction and aggression: conceptual issues and research findings. *Aggress Violent Behav* 5:147–157
- Insel TR (1986) Postpartum increases in brain oxytocin binding. *Neuroendocrinology* 44:515–518
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1:165–229
- Joppa MA, Rowe RK, Meisel RL (1997) Effects of serotonin 1A and 1B receptor agonists on social aggression in male and female syrian hamsters. *Pharmacol Biochem Behav* 58:349–353
- Kheramin S, Body S, Herrera FM, Bradshaw CM, Szabadi E, Deakin JF, Anderson IM (2005) The effect of orbital prefrontal cortex lesions on performance on a progressive ratio schedule: implications for models of inter-temporal choice. *Behav Brain Res* 156:145–152
- Kreiss DS, Lucki I (1994) Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* 269:1268–1279
- Lagerspetz KMJ, Hautojarvi S (1967) The effect of prior aggressive or sexual arousal on subsequent aggressive or sexual reactions in male mice. *Scand J Psychol* 8:1–6
- Lonstein JL, Gammie SC (2002) Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 26:869–888
- Lopez-Mendoza D, Guilar-Bravo H, Swanson HH (1998) Combined effects of Gepirone and (+) WAY 100135 on territorial aggression in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 61:1–8
- Maas JW (1962) Neurochemical differences between two strains of mice. *Science* 137:621–622
- Miczek KA, Hussain S, Faccidomo S (1998) Alcohol-heightened aggression in mice: attenuation by 5-HT_{1A} receptor agonists. *Psychopharmacology* 139:160–168
- Miczek KA, Fish EW, Bold JF, Almeida RMM (2002) Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology* 163:434–458
- Millan MJ, Hjorth S, Samanin R, Schreiber R, Jaffard R, De Ladonchamps B, Veiga S, Goument B, Peglion JL, Spedding G M, Brocco M (1997) S 15535, a novel benzodioxopiperazine ligand of serotonin (5-HT)_{1A} receptors: II. Modulation of hippocampal serotonin release in relation to potential anxiolytic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 282:148–161
- Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M (1992) Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 14:357–362
- Mos J, Olivier B (1986) RO 15-1788 does not influence postpartum aggression in lactating female rats. *Psychopharmacology* 90:278–280
- Mos J, Olivier B, Poth M, Aken H (1992) The effects of intraventricular administration of eltoprazine, 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine hydrochloride and 8-OH-DPAT on resident intruder aggression in the rat. *Eur J Pharmacol* 212:295–298
- Mos J, Olivier B, Poth M, Van Oorschot R, Van Aken H (1993) The effects of dorsal raphe administration of eltoprazine TFMPP and 8-OH-DPAT on resident-intruder aggression in the rat. *Eur J Pharmacol* 238:411–415
- Nelson RJ, Trainor BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8(7):536–546
- Neumann ID, Veenema AH, Beiderbeck DI (2010) Aggression and Anxiety: Social Context and Neurobiological Links. *Front Behav Neurosci* 4:12
- Olivier B, Mos J (1986) Serenics and aggression. *Stress Med* 197:209
- Olivier B, Van Oorschot R (2005) 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. *Eur J Pharmacol* 526:207–217
- Olivier B, Mos J, van Oorschot R (1985) Maternal aggression in rats: effects of chlordiazepoxide and fluprazine. *Psychopharmacology* 86:68–76
- Olivier B, Mos J, van Oorschot R (1986) Maternal aggression in rats: lack of interaction between chlordiazepoxide and fluprazine. *Psychopharmacology* 88:40–43
- Olivier B, Mos J, Van Der Heyden J, Hartog J (1989a) Serotonergic modulation of social interaction in male mice. *Psychopharmacology* 97:154–156
- Olivier B, Mos JM, Tulp M, Schipper J, Bevan P (1989b) Modulatory action of serotonin in aggressive behavior. In: Bevan P, Cools AR, Archer T (eds) *Behavioral pharmacology of 5-HT*. Lawrence Erlbaum Assoc, Hillsdale, pp 89–115
- Olivier B, Mos J, Hartog J, Rasmussen DL (1990a) Serenics: a new class of drugs for putative selective treatment of pathological destructive behaviour. *Drug News Persp* 3:261–271
- Olivier B, Mos J, Rasmussen D (1990b) Behavioural pharmacology of the serenic eltoprazine. *Rev Drug Metabol Drug Interact* 8:31–83
- Olivier B, Mos J, Raghoebar M, De Koning P, Mak M (1994) Serenics. *Prog Drug Res* 42:167–308
- Olivier BJ, Van Oorschot R, Hen R (1995) Serotonin receptors and animal models of aggressive behavior. *Pharmacopsychiatry* 28:80–90
- Padovan CM, Guimarães FS (2004) Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:15–19
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press
- Payne AP, Andrews MJ, Wilson CA (1984) Housing, fighting and biogenic amines in the midbrain and hypothalamus of the golden hamster. In: Miczek KA (ed) *Ethopharmacological aggression research*. Alan R. Liss, New York
- Potegal M (1991) Attack priming and satiation in female golden hamsters: tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggress Behav* 17:327–335
- Potegal M, Tenbrink L (1984) Behavior of attack-primed and attack-satiated female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Psychol* 98:66–75
- Roberts C, Price GW, Middlemiss DN (2001) Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res Bull* 56:463–469
- Russel JA, Leng G (1998) Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol* 157:343–359
- Sanchez C, Hyttel J (1994) Isolation-induced aggression in mice: effects of 5-HT uptake inhibitors and involvement of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 264:241–247
- Sanchez C, Arnt J, Moltzen EK (1996) The antiaggressive potency of (–)-penbutolol involves both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and betaadrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 297:1–8
- Séguin JR (2004) Neurocognitive elements of antisocial behavior: relevance of an orbitofrontal cortex account. *Brain Cogn* 55:185–197
- Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith DG (1989) 5-HT₁ agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br J Pharmacol* 96:283–290
- Sijbesma H, Schipper J, De Kloet ER, Mos J, Van Aken H, Olivier B (1991) Postsynaptic 5-HT₁ receptors and offensive aggression in rats: a combined behavioural and autoradiographic study with eltoprazine. *Pharmacol Biochem Behav* 38:447–458
- Sinton CM, Fallon SL (1988) Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT₁ receptor. *Eur J Pharmacol* 157:173–181

- Sprouse JS, Aghajanian GK (1986) Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT1A selective agonists. *Eur J Pharmacol* 128:295–298
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* 1:3–9
- Svare B (1990) Maternal aggression: hormonal, genetic, and developmental determinants. In: Krasnegor NA, Bridges RS (eds) *Mammalian parenting: biochemical, neurobiological and behavioral determinants*. Oxford UP, New York, pp 118–132
- Tellegen A, Horn JM (1972) Primary aggressive motivation in three inbred strain of mice. *J Comp Physiol Psychol* 78:297–304
- Valzelli L (1981) Psychopharmacology of aggression: an overview. *Int Pharmacopsychiatry* 16:39–48
- Vandermaelen CP, Matheson GK, Wilderman RC, Patterson LA (1986) Inhibition of serotonergic dorsal raphe neurons by systemic and iontophoretic administration of buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic drug. *Eur J Pharmacol* 129:123–130
- Van Erp AMM, Miczek KA (2000) Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *J Neurosci* 20:9320–9325
- Veiga CP, Miczek KA, Lucion AB, De Almeida RMM (2007) Effect of 5-HT1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res* 40:825–830
- Veit R, Flor H, Michael ERB, Hermann C, Lotze M, Grodd W, Birbaumer N (2002) Brain circuits involved in emotional learning in antisocial behavior and social phobia in humans. *Neurosci Lett* 328:233–236
- Volavka J (1995) *Neurobiology of violence*. American Psychiatric Press, Washington
- Volavka J (2002) Clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in the treatment of patients with chronic schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 159:255–262
- White SM, Kucharik RF, Moyer JA (1991) Effects of serotonergic agents on isolation-induced aggression. *Pharmacol Biochem Behav* 39:729–736

CAPÍTULO II

**PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E
RESPOSTA HORMONAL DE RATAS LACTANTES E MACHOS
ADULTOS WISTAR**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento Agressivo de Ratos Machos

Os ratos, sendo animais que vivem socialmente e defendem seu território, apresentam comportamento agressivo, que também é observado em outras espécies animais (Blanchard *et al.*, 1984). Este tipo de comportamento pode ser demonstrado em condições de laboratório, que mimetizam seu ambiente natural, utilizando variedades domesticadas de roedores (Blanchard *et al.*, 1984; Lucion e De Almeida, 1991).

Roedores machos manifestam comportamento agressivo de maneira contínua ao longo da vida, diferentemente das fêmeas, as quais apresentam agressividade em um período específico da vida; o período pós-parto (Grotta e Ader, 1974; Giovenardi *et al.*, 1998; De Almeida e Lucion, 1997; Giovenardi *et al.*, 2005; Miczek *et al.*, 2007).

A agressão nos machos é necessária para a aquisição e manutenção do alimento, estabelecimento de território e acasalamento. Este comportamento típico da espécie deve ser rigorosamente obedecido para que haja uma comunicação eficaz e inofensiva (Neumann *et al.*, 2010). Assim, a introdução de um novo animal, num território previamente estabelecido (Flannelly e Flannelly, 1987; Lucion e de Almeida, 1991), promove comportamentos de um rato macho residente, direcionado a um intruso, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente na natureza (Olivier *et al.*, 1989 a; Olivier *et al.*, 1989 b).

A agressividade ofensiva compreende primariamente um comportamento de ameaça inofensivo, seguido de escape do oponente ou mudança para um comportamento

submissivo para evitar um confronto físico direto (Neumann *et al.*, 2010). Em roedores, comportamentos que caracterizam a agressividade ofensiva incluem: piloereção (que intimida o oponente devido a uma aparência maior do animal) e postura agressiva (dorso arqueado com extensão das patas traseiras). A direção dos ataques ofensivos compreende partes do corpo com músculos e uma espessa camada de pele, importantes para evitar ferimentos graves (Blanchard e Blanchard, 1977; Blanchard *et al.*, 2003).

Enquanto a agressividade ofensiva é usualmente expressa durante a luta por território ou exclusivamente para o acasalamento, a agressividade defensiva é apresentada principalmente em situações que compreendem riscos de vida e estão associadas com aumento do medo (Blanchard e Blanchard, 1981 b). A agressividade defensiva não é sinalizada com antecedência, de maneira oposta à agressividade ofensiva, e os alvos dos ataques incluem partes do corpo mais vulneráveis como cabeça, barriga e genitais (Blanchard e Blanchard, 1977; Blanchard *et al.*, 2003).

Os circuitos neurais responsáveis pela modulação da impulsividade e violência (características do comportamento agressivo, já comentado no capítulo I, seção 1.3), apresentam plasticidade, ou seja, podem ser modificados, por meio de fatores ambientais, experiências vivenciadas pelo indivíduo e fatores endócrinos. Dessa forma, estes fatores influenciam a intensidade e a probabilidade de um encontro agonístico (Ferris, 2006; Ferris *et al.*, 2008).

O comportamento agressivo tem sido associado com numerosas condições neurológicas e psiquiátricas, incluindo ansiedade e desordens depressivas (Apter *et al.*, 1990; van Praag, 1998; Fehon *et al.*, 2001; Veenema *et al.*, 2007 b). Na pesquisa pré-clínica, o comportamento agressivo tem sido estudado, predominantemente, pela utilização natural de animais que defendem seu território (Blanchard *et al.*, 2003). Além disso, para

mimetizar formas anormais de agressividade nos machos e estudar os mecanismos neurais sobre agressividade, modelos animais como hipofunção de glicocorticóides (Haller *et al.*, 2001, 2004), bulbectomia olfativa (Leonard e Tuite, 1981; Mucignat-Caretta *et al.*, 2004), administração de álcool (Miczek *et al.*, 1997), provocação social, frustração não-recompensada (De Almeida *et al.*, 2005 b) e isolamento social seguido por suave contenção (Haas *et al.*, 2011, *comunicação pessoal*) têm sido desenvolvidos.

1.2 Período Pós-Parto

O período pós-parto envolve uma complexa coordenação de processos fisiológicos e comportamentais, importantes para o crescimento e desenvolvimento dos filhotes (Lonstein, 2005). Próximo ao parto, as mães começam a preparar-se para as demandas fisiológicas da lactação, as quais envolvem, por exemplo, mudanças na secreção de neuropeptídeos hipotalâmicos e hipofisários necessários para a produção e a liberação do leite (Lonstein, 2005). Mudanças hormonais que ocorrem durante o parto são seguidas por estímulos sensoriais produzidos pelos filhotes (Rosenblatt, 1975), sendo que estas mudanças explicam os comportamentos exibidos pelas fêmeas.

Após o parto, as ratas desenvolvem uma série de respostas comportamentais como: lambar, cheirar, cuidar e buscar os filhotes, acompanhadas por construção do ninho (Rosenblatt, 1975). Em adição a estes comportamentos, as fêmeas apresentam menos medo frente um estímulo de audição repentino (“sudden auditory”) (Hard e Hansen, 1985; Ferreira *et al.*, 2002) e apresentam uma redução da ansiedade nos testes do campo aberto (Fleming e Luebke, 1981) e labirinto em cruz elevado (Bitran *et al.*, 1991; Lonstein *et al.*,

1998; Pereira *et al.*, 2005), quando comparadas com fêmeas em outros estágios do ciclo reprodutivo (Agrati *et al.*, 2008).

No período pós-parto, as mães também devem estar preparadas para apresentarem uma série de comportamentos necessários para manter contato com os filhotes, e protegê-los de algum dano. Como exemplo de um destes comportamentos protetores da mãe para com a sua ninhada, a agressão maternal é um comportamento bem estabelecido (Lonstein, 2005).

O período da lactação proporciona um vínculo de ligação entre a mãe e os filhotes (Agrati *et al.*, 2008) e a habilidade das mães na percepção e na resposta às ameaças do meio são vitais durante o período pós-parto (Febo *et al.*, 2009). Durante o período da lactação, as respostas endócrinas e comportamentais das mães frente a um estímulo ameaçador são alteradas (Agrati *et al.*, 2008).

1.3 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

O sistema neuroendócrino responsivo ao estresse, conhecido como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) auxilia na manutenção e na adaptação do organismo, perante alguma mudança na homeostasia e também é vital para dar suporte ao funcionamento fisiológico do organismo (Kudielka e Kirschbaum, 2005).

Sob condições de estresse, o núcleo paraventricular do hipotálamo, especificamente os neurônios parvocelulares (pPVN) secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e também produzem vasopressina (Brunton *et al.*, 2008). A secreção de CRH provoca a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior

(Kudielka e Kirschbaum, 2005). Este, por sua vez, causa um aumento na síntese e na secreção dos glicocorticóides do córtex da adrenal (Kudielka e Kirschbaum, 2005). Os glicocorticóides têm ações importantes sobre o metabolismo e os mecanismos imunes (Tuckermann *et al.*, 2005; Vegiopoulos e Herzig, 2007; Brunton *et al.*, 2008). (Figura 1).

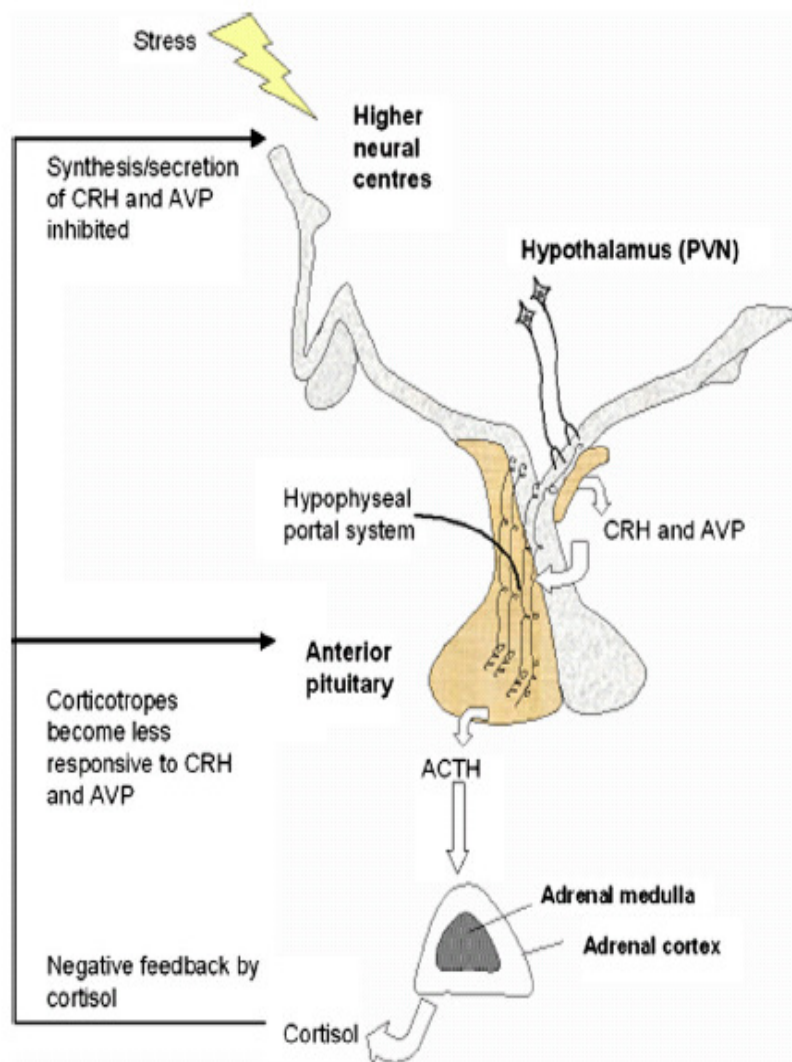


Figura 1 - Representação esquemática do eixo HPA. O estresse causa ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e consequente liberação dos neuropeptídeos: hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) no sistema porta-hipofisário. A ação combinada de CRH e AVP nas células corticotróficas da glândula hipófise anterior estimula a secreção de peptídeos derivados da pró-opiomelanocortina, a qual inclui o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). ACTH atua no córtex da glândula adrenal estimulando a síntese de glicocorticóides. Os glicocorticóides regulam a secreção de CRH, AVP e ACTH através de ações de *feedback* negativo no encéfalo, inibindo a

síntese e secreção de CRH e AVP e a glândula hipófise anterior, onde os corticotrofos começam a ser menos responsivos ao CRH e AVP. (Adaptado de Tilbrook e Clarke, 2006).

O eixo HPA é regulado pela retroalimentação tônica dos glicocorticóides (Brunton *et al.*, 2008; De Kloet *et al.*, 2008), que envolve receptores para glicocorticóides (GR) no encéfalo e nas células corticotróficas da hipófise (Figura 1), pela sinalização metabólica (Dallman *et al.*, 2006) (incluindo o tecido adiposo) e pelo ritmo circadiano no núcleo supraquiasmático (Watts *et al.*, 2004).

As fêmeas são responsivas a experiências estressantes e são mais vulneráveis a doenças mentais relacionadas a situações de estresse (Kendler, 1998; Shors e Leuner, 2003), mas, durante períodos específicos da vida, as fêmeas apresentam significantes flutuações nas respostas ao estresse (Leuners e Shors, 2006). Por exemplo, durante a prenhez, parto e pós-parto, ratas fêmeas e até mesmo mulheres apresentam uma marcada redução na reatividade perante situações estressantes, principalmente, àquelas relacionadas às respostas do eixo HPA (Thoman *et al.*, 1970; Stern *et al.*, 1973; Lightman e Young, 1989; Altemus *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2001; Kammerer *et al.*, 2002; Leuner e Shors, 2006).

Ratas lactantes apresentam uma responsividade diminuída do eixo HPA em resposta a uma grande variedade de estímulos estressantes emocionais como: labirinto em cruz elevado, estresse por som, estresse social, bem como estímulos estressantes físicos: exposição ao éter, choque nas patas, nado forçado, injeção de salina hipertônica e injeção de lipossacarídeo (Thoman *et al.*, 1970; Stern e Levine, 1972; Stern *et al.*, 1973; Myers *et*

al., 1975; Lescoat e Maniey, 1976; Smotherman *et al.*, 1976; Lightman e Young, 1987; Walker *et al.*, 1992, 1995; Windle *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 1998; Lightman *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2001). (Figura 2).

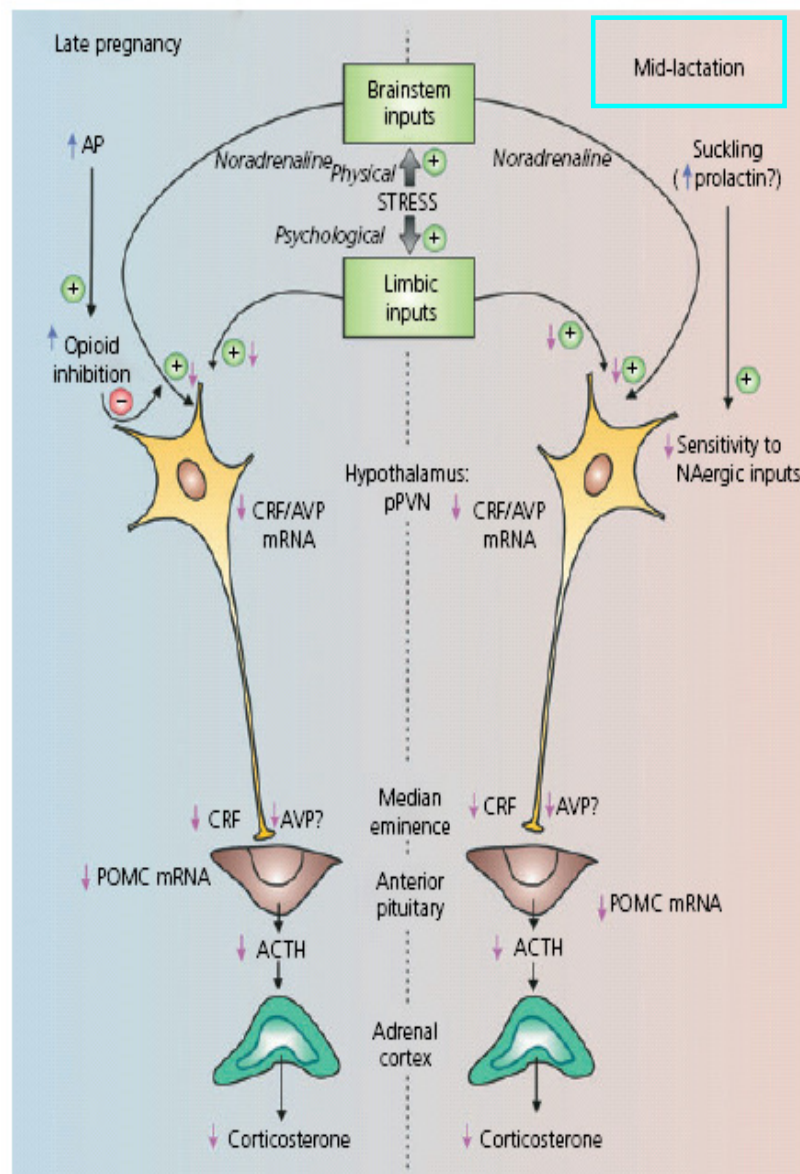


Figura 2 - Mecanismos de redução na atividade do eixo HPA induzido pelo estresse no final da prenhez e na lactação, em ratos. Destaque em azul para a lactação. Na

lactação, estressores estimulam menos os neurônios a secretarem CRH e AVP, do que nas ratas virgens; isto é refletido através da estimulação reduzida da biossíntese de CRH e AVP no pPVN. CRH e AVP são liberados na eminência mediana e também são atenuados nas lactantes e no final da gestação, quando comparados com ratas não prenhez, resultando numa estimulação reduzida do gene que transcreve para ACTH, na hipófise anterior. Por conseguinte, ocorre redução na liberação de ACTH na hipófise anterior e secreção diminuída de corticosterona do córtex adrenal. Também ocorre uma redução nas aferências de CRH e AVP no pPVN proveniente de regiões do tronco encefálico e límbicas. Em particular, há uma redução na sensibilidade do receptor α_1 noradrenérgico, na lactação. O estímulo da sucção pelos filhotes tem um papel essencial na manutenção da hiporresponsividade do eixo HPA na lactação, todavia, os mecanismos precisos não estão elucidados (Reproduzido de Brunton *et al.*, 2008).

Em ovelhas, a secreção de cortisol em resposta ao isolamento, estresse por contenção ou exposição ao latido de cachorro é também atenuada na lactação (Cook, 1997; Tilbrook e Clarke, 2006).

Em mulheres lactantes, a responsividade reduzida do eixo HPA tem sido encontrada após exercício físico ou estresse por frio, mas não frente a um estressor emocional (Altemus *et al.*, 1995, 2001; Kammerer *et al.*, 2002), a menos que a mãe tenha amamentado por um curto período de antecedência (Heinrichs *et al.*, 2001, 2002).

A hiporresponsividade ao estresse durante a lactação tem sido relacionada com o perfil endócrino da gestação, parto e lactação, e em especial aos hormônios lactogênicos ocitocina e prolactina de ratas lactantes (Windle *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2000; Lightman *et al.*, 2001; Torner *et al.*, 2002). (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos de alterações neuroendócrinas e comportamentais observadas na prenhez e lactação

Behavioural alterations	References
HPA axis alterations	
Chronic basal hypercorticalism and altered diurnal pattern	(Stern <i>et al.</i> 1973; Walker <i>et al.</i> 1995; Windle <i>et al.</i> 1997b; Lightman <i>et al.</i> 2001)
Decreased responsiveness of HPA axis (ACTH, corticosterone) to psychological and physiological stressors	(Stern <i>et al.</i> 1973; Windle <i>et al.</i> 1997b; Neumann <i>et al.</i> 1998a; Shanks <i>et al.</i> 1999; Lightman <i>et al.</i> 2001; Neumann <i>et al.</i> 2001; Walker <i>et al.</i> 2001; Brunton & Russell, 2003)
Decreased stressor perception and stress-induced expression of <i>c-fos</i> in limbic brain regions	(da Costa <i>et al.</i> 1996)
Alterations in excitatory pathways	
Decreased noradrenergic excitatory tone in the PVN	(Toufexis <i>et al.</i> 1998; Douglas, 2005)
Reduced excitatory opioid tone on CRF neurons	(Douglas <i>et al.</i> 1998)
Attenuated pituitary sensitivity to CRF	(Neumann <i>et al.</i> 1998a; Toufexis <i>et al.</i> 1999a)
Decreased sympathetic responsiveness to stressors	(Douglas <i>et al.</i> 2005)
Alterations in inhibitory pathways	
Elevated OXT system activity	(Insel, 1990; Douglas & Russell, 1994)
Increased prolactin synthesis and binding	(Pi & Grattan, 1999; Torner <i>et al.</i> 2002)
Decreased CRF mRNA expression in the PVN	(Johnstone <i>et al.</i> 2000; Lightman <i>et al.</i> 2001; Walker <i>et al.</i> 2001)
Alterations in behaviour	
Increased maternal behaviour including aggressive behaviour	(Rosenblatt <i>et al.</i> 1994; Neumann <i>et al.</i> 2001)
Increased calmness, reduced anxiety and reduced emotional responsiveness to stressors	(Carter <i>et al.</i> 2001; Heinrichs <i>et al.</i> 2001; Glynn <i>et al.</i> 2004)

(Reproduzido de Slattery e Neumann, 2008).

Ratas virgens induzidas a apresentarem comportamento maternal sem tratamento hormonal – procedimento este conhecido como sensitização (Fleming e Rosenblatt, 1974; Rosenblatt, 1975; Cosnier e Couturier, 1966), e ratas no período pós-parto telectomizadas

(Stern e Levine, 1972) respondem com uma alta secreção de corticosterona frente a um estressor físico, como éter.

Desta forma alguns trabalhos tentam esclarecer quais seriam as possíveis causas desta atenuação da resposta do eixo HPA em ratas lactantes, frente a algumas situações de estresse (Da Costa *et al.*, 1996; Toufexis e Walker, 1996; Douglas *et al.*, 1998; Johnstone *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2001).

Em contrapartida, machos adultos apresentam algumas diferenças quanto a resposta do eixo HPA, quando comparadas com fêmeas lactantes. Por exemplo, machos adultos apresentam níveis basais de corticosterona menores do que fêmeas lactantes (Koolhaas *et al.*, 1997).

Outra diferença é que quando os machos são submetidos a situações estressantes, como o teste residente/intruso, isolamento social e estresse por contenção, eles apresentam um aumento na secreção de corticosterona (Hucklebridge e Nowell, 1974; Gamallo *et al.*, 1986; Zayan, 1991; Haller *et al.*, 1995; Wotjak *et al.*, 1996; Koolhaas *et al.*, 1997; Miczek *et al.*, 1999; Veenema *et al.*, 2007 b; Ren *et al.*, 2010).

Vários estudos têm sido realizados para compreender as bases hormonais (Mayer e Rosenblatt, 1987; Mayer *et al.*, 1990; Albert *et al.*, 1992) e neurobiológicas (Ferreira *et al.*, 1987; Hansen, 1989; Factor *et al.*, 1990; Kolunie e Stern, 1995; Consiglio e Lucion, 1996; Lonstein *et al.*, 1998) do comportamento agressivo em fêmeas lactantes, mas as respostas neuroendócrinas de ratas residentes lactantes têm sido pouco estudadas (Neumann *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Muitos estudos foram realizados com o intuito de compreender as bases hormonais e neurobiológicas da agressividade em fêmeas durante o período pós-parto, mas, por outro lado, as respostas neuroendócrinas de ratas residentes lactantes têm sido pouco estudadas. Assim, trabalhos que buscam avaliar os níveis hormonais de ratas lactantes, após um determinado tipo de estresse, como a provocação social, possibilitam a compreensão, pelo menos em parte, do funcionamento do eixo HPA durante o período específico da lactação. Sabendo-se que não há dados na literatura relacionando provocação social e atividade do eixo HPA em ratas lactantes, o objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas neuroendócrinas, bem como o padrão comportamental de ratas lactantes submetidas a um estressor emocional, utilizando para isto o protocolo da provocação social.

2.2 Objetivos Específicos

Em ratas lactantes submetidas à provocação social, avaliar os níveis plasmáticos de:

- Corticosterona;
- Ocitocina;
- Prolactina e
- Progesterona.

Em machos adultos provocados socialmente, avaliar os níveis plasmáticos de:

- Corticosterona e
 - Testosterona.
-

ARTIGO 2

EFFECT OF SOCIAL INSTIGATION AND OF AGGRESSIVE BEHAVIOR ON THE
HORMONAL RESPONSE OF LACTATING DAMS AND ADULT MALE WISTAR
RATS

Artigo submetido para publicação na revista Hormones and Behavior

Elsevier Editorial System(tm) for Hormones and Behavior

Manuscript Draft

Manuscript Number: HB-10-361

Title: EFFECT OF SOCIAL INSTIGATION AND OF AGGRESSIVE BEHAVIOR ON THE HORMONAL RESPONSE OF LACTATING DAMS AND ADULT MALE WISTAR RATS

Article Type: Original Research Article

Keywords: Social Instigation, Lactating Rats, Corticosterone, Male, HPA Axis

Corresponding Author: Mrs. Rosa M de Almeida,

Corresponding Author's Institution: Instituto de Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento

First Author: Caroline P da Veiga

Order of Authors: Caroline P da Veiga; Bruno C Aranda; Dirson Stein; Celso R Franci; Klaus A Miczek; Aldo B Lucion; Caroline Perinazzo Veiga; Rosa M de Almeida

**EFFECT OF SOCIAL INSTIGATION AND OF AGGRESSIVE BEHAVIOR ON
THE HORMONAL RESPONSE OF LACTATING DAMS AND ADULT MALE
WISTAR RATS**

Caroline Perinazzo da Veiga^a; Bruno Cerpa Aranda^b, Dirson Stein^a, Celso Rodrigues Franci^c, Klaus A. Miczek^d, Aldo Bolten Lucion^e, Rosa Maria Martins de Almeida^f

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cDepartamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil.

^dDepartments of Psychology, Pharmacology, Neuroscience and Psychiatry, Tufts University, Medford and Boston, USA.

^eDepartamento de Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^fInstituto de Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento.

Corresponding author:

Rosa Maria Martins de Almeida
Instituto de Psicologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Bairro Santa Cecília
Porto Alegre - RS – Brasil
CEP 90035-003 - Fone: +55 (51) 3308-5066 – Fax: +55 (51) 3308-5470
e-mail: rosa_almeida@yahoo.com or rosa.almeida@ufrgs.br

Abstract

Among rodents, maternal aggression in the postpartum period represents a species-typical adaptation, but when aggressive behavior increases beyond this adaptive level, this can represent a model of excessive aggression. Social instigation is an experimental protocol that leads to escalated aggressive behaviors. Lactating rats show an attenuated HPA axis response to a wide variety of emotional stressors. This study is the first to assess the neuroendocrine response of lactating rats and of socially instigated male rats. The aim of the present study was to assess neuroendocrine responses and the behavioral pattern of lactating rats and males that were submitted to an emotional stressor, using the social instigation protocol. In particular, we measured plasma corticosterone levels as the key hormonal parameter of the HPA axis, and later, oxytocin, prolactin and progesterone, which are released in response to several types of stressors. Our results show that lactating rats that were submitted to social instigation or to an aggressive confrontation in the presence of their pups show lower plasma corticosterone levels and this response is similar to oxytocin, prolactin and progesterone levels. By contrast, male rats showed increased corticosterone levels obtained after being submitted only to social instigation and also in male rats that engaged in aggressive behavior relative to the control group. In conclusion, this study demonstrates that lactating rats submitted to social instigation show an attenuation of the HPA axis response, which is considered to be crucial to the dam's welfare so that it can take care of its offspring. Thus, we can infer that the lactation is a relevant factor on the neuroendocrinic responses to stress because in males there is an increasing of corticosterone levels.

KEYWORDS: SOCIAL INSTIGATION, LACTATING RATS, CORTICOSTERONE, MALE, HPA AXIS

Research Highlights

> Social instigation is an experimental protocol that escalated aggressive behaviors. > We analyzed the neuroendocrine response of lactating rats and adult males. > Lactating rats submitted to social instigation show lower plasma corticosterone. > In males the response was opposite in females. > Lactating show an attenuation of the HPA axis response after social instigation.

1. Introduction

The postpartum period constitutes a complex suite of physiological and behavioral processes that are important to offspring growth and development (Lonstein, 2005). Maternal aggression is observed during lactation and serves to protect the pups and defend the territory against intruders (Erskine et al., 1978; Lonstein, 2005; Lonstein and Gammie, 2002; Numan and Insel, 2003; Rosenblatt et al., 1994). In rats, maternal aggressive behavior is more frequent between postpartum days (PPD) 3 and 12, on which dams show intense caring for their young (Consiglio and Bridges, 2009; Erskine et al., 1978). Some studies suggest that persistence of maternal aggression depends on olfactory stimuli from the litter (Ferreira et al., 1987), and also that aggression is less affected by maternal age than by early lactation (Takahashi and Lore, 1982). Among rodents, maternal aggression in the postpartum period represents a species-typical adaptation, but when aggressiveness

increases beyond this period, this can represent a model of excessive aggression, bearing resemblance to a clinical pattern. Therefore, dams in the postpartum period can be used as a model of naturally increased aggression associated with social instigation (Veiga et al., 2010).

Social instigation is an experimental protocol used to heighten species-typical aggressive behaviors (Veiga et al., 2010). This procedure is highly effective in increasing aggressive behavior in animals by instigating the resident by its proximity to an opponent (Potegal, 1991). Mice, rats and hamsters carry out attacks with a very low latency and at a high frequency when provoked by an intruder in their home cage or in an unfamiliar place, after having been previously provoked by an opponent (De Almeida and Miczek, 2002; Fish et al., 1999; Potegal, 1991). Social instigation specifically increases the aggressive behavior and does not activate locomotion, feeding or sexual behavior (Lagerspetz and Huatojarvi, 1967; Potegal, 1991; Potegal and Tenbrink, 1984). A recent study conducted by Veiga et al. (2010) has shown that lactating rats significantly increase their aggressiveness when submitted to social instigation.

The lactation period facilitates bonding between the mother and its pups (Agrati et al., 2008) and the ability mothers have to perceive and respond to threats are vital during the postpartum period (Febo et al., 2009). Endocrine and behavioral responses of mothers to a threatening stimulus change during lactation (Agrati et al., 2008). The stress-responsive neuroendocrine system, known as hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis helps maintain and adapt the body to any disturbance in homeostasis and is also essential to support the body's physiological functions (Kudielka and Kirschbaum, 2005). Under stress, the paraventricular nucleus of the hypothalamus, more specifically the parvocellular paraventricular nucleus (pPVN) secretes the corticotropin-releasing hormone (CRH) and

also produces vasopressin (Brunton et al., 2008). CRH secretion leads to the release of the anterior pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Kudielka and Kirschbaum, 2005), and this hormone, in turn, increases the synthesis and secretion of glucocorticoids from the adrenal cortex (Kudielka and Kirschbaum, 2005).

Lactating rats show attenuated HPA axis response to a wide variety of emotional stressors, such as elevated plus maze, noise stress, social stress, as well as physical stressors (exposure to ether, foot shock, forced swimming, hypertonic saline injection and liposaccharide injection (Lescoat and Maniey, 1976; Lightman and Young, 1987, 1989; Lightman et al., 2001; Myers et al., 1975; Neumann et al., 1998, 2001; Stern and Levine, 1972; Stern et al., 1973; Smotherman et al., 1976; Thoman et al., 1970; Walker et al., 1992, 1995; Windle et al., 1997). In sheep, cortisol secretion in response to isolation, restraint stress or exposure to dog barking, is also attenuated during lactation (Cook, 1997; Tilbrook and Clarke, 2006). This decrease in stress response has been associated with the endocrine profile of lactation, delivery and lactation, and especially to lactogenic hormones such as oxytocin and prolactin in lactating rats (Lightman et al., 2001; Neumann et al., 2000; Torner et al., 2002; Windle et al., 1997). Some studies have sought to elucidate the possible causes of attenuated HPA axis response in lactating rats to some stressful situations (Da Costa et al., 1996; Douglas et al., 1998; Johnstone et al., 2000; Neumann et al., 2001; Toufexis and Walker, 1996). On the other hand, adult males have lower basal corticosterone levels than do lactating dams (Koolhaas et al., 1997) and when submitted to stressful situations as, for instance, to the resident-intruder test, social isolation and restraint stress, male rats show an increase in corticosterone secretion (Gamallo et al., 1986; Haller et al., 1995; Hucklebridge and Nowell, 1974; Koolhaas et al., 1997; Li et al., 2010; Miczek et al., 1999; Veenema et al., 2007; Zayan, 1991; Wotjak et al., 1996).

Several studies have been carried out to provide further understanding about hormonal (Albert et al., 1992; Mayer and Rosenblatt, 1987; Mayer et al., 1990) and neurobiological bases (Consiglio and Lucion, 1996; Factor et al., 1990; Ferreira et al., 1987; Hansen, 1989; Kolunie and Stern, 1995; Lonstein et al., 1998) of the aggressive behavior in lactating rats, but the neuroendocrine responses of lactating resident rats have been underinvestigated (Neumann et al., 2001). The aim of the present study was to assess neuroendocrine responses and the behavioral pattern of lactating rats submitted to an emotional stressor, using the social instigation protocol. In particular, we assessed plasma corticosterone levels as the main hormonal parameter of the HPA axis, and later, oxytocin, prolactin and progesterone, which are released in response to several types of stressors. Thereafter, the same parameters mentioned above were assessed in adult male rats submitted to social instigation.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

For the experiments, we used primiparous Wistar rats and adult male Wistar rats aged around 90 days, from the Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), southern Brazil. The animals were kept under controlled temperature (21 ± 1 °C) and light (12-hour light-dark cycle, and lights off at 3 p.m.). Each female was individually housed in transparent acrylic boxes measuring 46cm×31cm×17 cm, receiving food and water *ad libitum*. The delivery date was controlled, and the day of birth of the pups was set as date 0 (PPD 0). On PPD 1, the pups were standardized to eight per litter, irrespective of sex. To test the aggressive behavior of lactating rats, intruder males (Intr) were used, which weighed approximately 50 g less than females. Stimulus males (Inst) were also used, which

were protected by an acrylic tube, not having a direct contact with residents. Intr and Inst rats were maintained in groups of five per box. Inst rats were never used as Intr. Adult male rats were kept in individual acrylic boxes, of the same size described above, together with an adult female for 14 days. To test the aggressive behavior of adult male rats, intruder males were also used, which weighed around 30 g less than the resident and stimulus rats; however, stimulus males were bigger than the resident ones. The experiments were performed in compliance with the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Research Ethics Committee of this institution.

2.1.1 Confrontation between resident and intruder rats

On PPD 3, female rats were selected for aggressive behavior and only those which bit the intruder more than twice during 10 min of confrontation were used for the experiment. The behavioral test was carried out in the resident female's box in the presence of pups at the beginning of the dark period. From PPD 3 to 12, a high level of aggressive behavior was observed among females, but after this period, the aggressive behavior began to attenuate (Erskine et al., 1978; Mos and Olivier, 1986). The males were not previously selected for aggressive behavior as the aim of the study was to assess hormonal response after social instigation and the aggressive confrontation.

2.1.2 Social instigation

2.1.2.1 Female rats

The social instigation procedure was performed on PPD 5 (Figure 1). Social instigation consists in placing an acrylic tube with holes (28 cm in length, 10 cm in

diameter) containing an opponent (stimulus) male for 5 min in the resident female's box. Residents typically threaten the protected stimulus male and attack the perforated cylindrical tube. In general, rodents carry out attacks at a very low frequency and latency when confronted with an intruder in their boxes after having been previously instigated by an opponent (Potegal, 1991). The pups remained in the box with their mothers during social instigation.

2.1.2.2 Male rats

After 14 days of adaptation in the animal facility, adult rats with approximately 74 days of age were submitted to social instigation. The female rats were kept in the residents' box up to the beginning of social instigation. Social instigation was carried out following the previously described protocols for female rats.

2.1.3 Maternal aggressive behavior

On PPD 5, 5 min after the end of social instigation, maternal aggressive behavior against a male intruder was tested for 10 min. The behavioral repertoire previously defined by De Almeida and Lucion (1997) included the frequency of aggressive behaviors: lateral attack, aggressive attitude, biting and dominance, and duration of non-aggressive behaviors, such as investigating the intruder, self-cleaning, raising the forepaws, interacting with the pups and walking. Social instigation and maternal aggressive behavior were filmed and later analyzed by an examiner using the Observer software (version 3.0, Noldus, the Netherlands).

Total aggressive behavior was calculated by adding the frequency of aggressive behaviors (lateral attack + biting the intruder's body + aggressive attitude + aggressive

cleaning) and the duration of aggressive behaviors (aggressive attitude), adapted from De Almeida *et al.*, 2008.

The lactating rats were split into the following experimental groups:

1) No social instigation and no aggressive behavior (NI + NA) – the acrylic tube was placed empty (without the stimulus rat) in the resident's box and the rats were not submitted to maternal aggressive behavior;

2) Social instigation but no aggressive behavior (I + NA) – the acrylic tube was placed in the resident's box with the stimulus rat and the rats were not submitted to maternal aggressive behavior;

3) No social instigation but aggressive behavior (NI + A) – the acrylic tube was placed empty (without the stimulus rat) in the resident's box and the rats were submitted to maternal aggressive behavior;

4) Social instigation and aggressive behavior (I + A) - the acrylic tube was placed in the resident's box with the stimulus rat and the rats were submitted to maternal aggressive behavior.

2.1.3 Male aggressive behavior

Five minutes after the end of social instigation, adult males were submitted to aggressive behavior against an intruder male for 10 min. Given that males did not have a baseline level of aggressiveness, it was not possible to assess their behavioral repertoire, as they did not show an aggressive behavior against the intruder.

The rats were split into the following experimental groups:

1) No social instigation and no aggressive behavior (NI + NA) – the acrylic tube was placed empty (without the stimulus rat) in the resident's box and the rats were not submitted to aggressive behavior;

2) Social instigation but no aggressive behavior (I + NA) – the acrylic tube was placed in the resident's box with the stimulus rat and the rats were not submitted to aggressive behavior;

3) No social instigation but aggressive behavior (NI + A) - the acrylic tube was placed empty (without the stimulus rat) in the resident's box and the rats were submitted to aggressive behavior;

4) Social instigation and aggressive behavior (I + A) - the acrylic tube was placed in the resident's box with the stimulus rat and the rats were submitted to aggressive behavior.

2.1.4 Hormone doses

Ten minutes after the end of the aggressive behavior (or 25 min after social instigation), on PPD 5, the lactating dams were decapitated and their blood was collected and placed in previously heparinized tubes. The males were also decapitated after the same period, at 74 days old. The samples were centrifuged at 4°C (15 min at 1,500 rpm) and the plasma was separated and stored at -20° C. Corticosterone was previously extracted from the plasma with ethanol and then resuspended in phosphate buffer for the radioimmunoassay, which used a standard and specific antibody purchased from Sigma (USA), and tritiated corticosterone purchased from Amershan (USA). Free and bound fractions were separated using dextran-coated charcoal (0.5 / 0.05%). The oxytocin which had been previously extracted from the plasma using acetone and ether was resuspended in phosphate buffer for the radioimmunoassay. The oxytocin-specific antibody raised in

rabbits and the iodinated hormone were kindly provided by Dr. Mariana Morris (Wright State University, USA) and by Prof. Dr. José Antunes Rodrigues (School of Medicine of Ribeirão Preto-USP, Brazil), respectively. The reference standard (OT-8152) was purchased from Bachem- Peninsula Laboratories (California, USA). The plasma concentrations of prolactin were determined by double-antibody radioimmunoassay using a set of reagents obtained from the National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA, USA). Rat PRL-RP₃ was used as reference preparation. The hormone was iodinated and purified at Dr. Celso Rodrigues Franci's laboratory (School of Medicine of Ribeirão Preto-USP, Brazil). The anti-gamma globulin used for precipitation of the reaction in prolactin and oxytocin assays was produced in sheep by Dr. Celso Rodrigues Franci (School of Medicine of Ribeirão Preto-USP, Brazil). The plasma concentrations of progesterone were determined by radioimmunoassay using sets of commercially available reagents ((DSL-Diagnostic System Laboratories, USA). The samples were dosed in the same assay as each hormone and the intra-assay error was 4.5% for oxytocin, 3.5% for prolactin, 5% for corticosterone, and 3.5% for progesterone. The minimum detection limits were respectively 0.4 ng/ml (oxytocin); 0.2ng/ml (prolactin); 2.0 ng/ml (corticosterone); and 0.3 ng/ml (progesterone). The hormones were dosed at Dr. Celso R. Franci's laboratory.

2.6 Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM. The results of hormone doses of the four experimental groups (NI + NA, I + NA, NI + A and I + A) were assessed using one-way ANOVA. When the difference was statistically significant, with a $p < 0.05$, the Newman-Keuls test was used as a post hoc analysis. The aggressive behaviors of female rats in both groups submitted to the aggressive behavior test (NI + A and I + A) were

analyzed by Student's t test, followed by the Mann-Whitney test when the difference was statistically significant, with a $p < 0.05$. With respect to non-aggressive motor behaviors, the results for all groups were compared with each other using ANOVA, with a Newman-Keuls post hoc test when the difference was statistically significant.

3. Results

Lactating rats

As to hormone doses, lactating rats in the NI + A group showed lower plasma corticosterone levels ($F=3,41=3,69$; $p < 0.05$; Figure 2) when compared to lactating rats in the NI + NA group (control group). Socially instigated lactating rats submitted to aggressive confrontation also reduced corticosterone levels ($F=3,41=3,69$; $p < 0.05$; Figure 2) when compared to lactating rats in the NI + NA group. Rats exposed only to aggressive behavior (NI + A group) showed lower plasma oxytocin levels ($F=3,48=3,22$; $p < 0.05$; Figure 3) when compared to the control group. As to prolactin, female rats in the NI + A group had a lower plasma prolactin level ($F=3,45=3,94$; $p < 0.05$; Figure 4) while female rats in the I + A group ($F=3,48=3,94$; $p < 0.05$; Figure 4) also showed a lower level when compared with the control group. On the other hand, aggressive confrontation alone (NI + A group) reduced progesterone levels ($F=3,57=3,32$; $p < 0.05$; Figure 5) when compared with the control group.

Overall aggressiveness was not statistically significant between the NI + A and the I + A groups ($t_{19}=0,31$; $p=0.7$; Figure 6). With respect to non-aggressive behaviors, the rats submitted only to social instigation (I + NA group) reduced their total walking time ($F=3,41=4,53$; $p < 0.05$; Table 1) when compared with the rats in the I + A group; this same group (I + NA) also reduced total walking time ($F=3,41=4,53$; $p < 0.05$; Table 1)

when compared with the NI + A group. Rats in the I + A group increased their total walking time ($F=3,41=4,53$; $p<0.05$; Table 1) when compared with the control group, while female rats submitted only to aggressive behavior (NI + A group) also increased their total walking time ($F=3,41=4,53$; $p<0.05$; Table 1) when compared with the control group. Rats in the NI + A group reduced the time of interaction with their pups ($F=3,41=4,18$; $p<0.05$; Table 1) when compared with the control group, whereas rats in the I + A group also reduced the time of interaction with their pups ($F=3,41=4,18$; $p<0.05$; Table 1) when compared with the control group. Grooming lasted longer among rats of the I + NA group ($F=3,41=8,88$; $p<0.001$; Table 1) when compared with those of the NI + NA group. The duration of grooming in rats of the I + NA group also increased ($F=3,41=8,88$; $p<0.001$; Table 1) when compared with the control group, and also in those rats of the NI + A group ($F=3,41=8,88$; $p<0.001$; Table 1) when compared with the group of rats submitted only to aggressive behavior. Rearing did not yield statistically significant differences when the groups were compared with each other ($F=3,41=0,32$; $p=0.8$; Table 1).

Adult male rats

Male rats submitted only to confrontation with an intruder (NI + A group) increased their corticosterone levels ($F=3,33=4,87$; $p<0.05$; Figure 7) when compared with the control group (NI + NA group). Social instigation alone (I + NA group) also increased corticosterone levels ($F=3,33=4,87$; $p<0.05$; Figure 7) when compared with the control group. On the other hand, rats of the I + A group reduced their corticosterone levels ($F=3,33=4,87$; $p<0.05$; Figure 7) when compared with the NI + A group, while rats of the I + A group also reduced their corticosterone levels ($F=3,33=4,87$; $p<0.05$; Figure 7)

when compared with the I + NA group. Plasma testosterone levels did not show statistically significant differences when the groups were compared with each other ($F=3,36=1,91$; $p=0.1$; Figure 8).

4. Discussion

Experiments reveal that lactating rats submitted to social instigation or to aggressive confrontation, in the presence of their pups, show lower plasma corticosterone levels and that this response is also valid when oxytocin, prolactin and progesterone were dosed. The present study is the first to assess the neuroendocrine response of lactating rats and of socially instigated male rats. Previous studies demonstrated that lactating rats without pups show an attenuated activity of the HPA axis in response to stress, and this attenuation is evident as a not significant increase in corticosterone levels. Some evidence shows a significant increase in plasma corticosterone in response to emotional and physical stressors, however this increase is smaller as compared to virgin rats (Lescoat and Maniey, 1976; Lightman and Young, 1987, 1989; Lightman et al., 2001; Myers et al., 1975; Neumann et al., 1998, 2001; Smotherman et al., 1976; Stern and Levine, 1972; Stern et al., 1973; Thoman et al., 1970; Walker et al., 1992, 1995; Windle et al., 1997), but there are few studies that use the maternal defense test or the resident-intruder test to assess the stress responses of lactating rats (Deschamps et al., 2003; Neumann et al., 2001; Neumann, 2003). Our experiments show that social instigation followed by aggressive behavior can be regarded as an acute emotional stressor, similarly to the maternal defense paradigm (Neumann et al., 2001), being likely to lower plasma corticosterone levels.

Our results indicate that socially instigated female rats with an aggressive behavior reduced their corticosterone levels when compared with the NI + NA group (control group). The presence of an intruder lowered corticosterone levels, as observed in the NI + A group; however, social instigation alone could not alter corticosterone levels, with social instigation tending to lower corticosterone levels, as shown by the I + NA group. Thus, variations in corticosterone levels do not depend on the frequency of aggressive behavior exhibited by lactating rats (Figure 6). The most important factor was the presence of the intruder. We can infer that lactation interferes with the attenuation of the HPA axis, as corticosterone secretion increases in virgin (non-lactating) rats after the resident-intruder test (Deschamps et al., 2003). Basal corticosterone levels were high in lactating rats of the control group when compared with virgin (non-lactating) rats, according to Fischer et al. (1995) and to Lightman et al. (2001). In women, basal cortisol is also high among breastfeeding mothers when compared to menstruating women in the eighth week after childbirth (Kammerer et al., 2002). According to Stern and Voogt (1973), stress response of the HPA axis during lactation overlaps an elevated baseline level of HPA axis activity. Stress response in lactating rats, in which there is a reduction in plasma corticosterone levels, could be due to a decrease in ACTH response to stressful situations as a result of lower CRH production and its consequent lower release by pPVN (Brunton et al., 2008). As to baseline levels in lactating rats, in which plasma corticosterone concentration is elevated, another contributing factor to a higher baseline activity of the HPA axis is the continuous presence of pups. This was demonstrated in experiments in which ACTH and corticosterone levels began to decrease when pups were taken away from their mothers for 3.5 h (Fischer et al., 1995; Walker et al., 1992). Pup retrieval after separation from the dams, which quickly started to take care of their offspring, stimulated maternal ACTH

secretion (Walker et al., 1992). Therefore, it is evident that a higher baseline activity of the HPA axis is given by suckling (Brunton et al., 2008) and that suckling is an important neuroendocrine stimulus that also increases prolactin and oxytocin secretion, which is essential for milk production (Deschamps et al., 2003; Walker et al., 1992).

As to aggressiveness, social instigation did not increase aggressive behavior of lactating rats because of a large variability among individuals of the same group. Similar effects were also found by Padovan and Guimarães (2004) and a larger number of animals may be necessary to assess aggressiveness in lactating rats, taking into consideration that previous studies by Veiga et al. (2010), in which aggressive behavior was found to have increased after social instigation, used a larger number of experimental animals.

In regard to the corticosterone levels obtained for male rats, our results indicate that they increased in rats submitted only to social instigation (I + NA group) and also in the group with aggressive behavior (NI + A group) when compared to the control group. Therefore, the data obtained here are consistent with those described in the literature, where a single episode of social stress, using the resident-intruder test, increased corticosterone levels in male rats (Haller et al., 1995; Hucklebridge and Nowell, 1974; Miczek et al., 1999; Koolhaas et al., 1997; Zayan, 1991; Wotjak et al., 1996). In male rodents, social conflict events, such as social defense, have also been widely acknowledged as acute or chronic emotional stressors (Haller et al., 1995; Neumann et al., 2001; Raab et al., 1986; Wotjak et al., 1996).

With respect to plasma oxytocin, its levels decreased in female rats submitted only to aggressive behavior (NI + A group) when compared with the control group. Carter and Lightman (1987) perceived that lactating rats on PPD 6 tended to lower their oxytocin levels after being submitted to acute immobilization stress. Other studies also described this

reduction in the circulating levels of oxytocin in lactating rats submitted to a stressful stimulus, compared with non-lactating rats (Higuchi et al., 1988; Lightman and Young, 1989; Neumann, 2003).

Prolactin is also activated in response to physical and emotional stressors (Neill, 1970; Seggie and Brown, 1975). Our results show that socially instigated female rats with an aggressive behavior had lower prolactin levels, but it should be noted that this reduction also occurs in the group of rats submitted only to aggressive behavior (NI + A group). Previous studies also demonstrated low prolactin levels in lactating rats after exposure to stress (Banky et al., 1994; Higuchi et al., 1989, 1992; Kehoe et al., 1992; Walker et al., 1992) and also after the maternal defense test (Neumann et al., 2001). Thus, our results concur with the data shown in the literature.

As far as plasma progesterone is concerned, rats submitted only to aggressive behavior (NI + A group) revealed lower levels of this hormone when compared with the control group. This reduction might contribute, in part, to the attenuation of the HPA axis response (Lightman et al., 2001). Our results corroborate those presented in the literature, as Lightman et al. (2001) showed that progesterone induces the hyporesponsiveness of the HPA axis in lactating rats because, after an 11-day treatment with estradiol implants and with daily injections of progesterone in virgin ovariectomized rats, the three-day withdrawal of progesterone before the test significantly reduced the activation of the HPA axis, comparatively with animals in which progesterone was given continuously.

This reduction in the response of the HPA axis of lactating rats to environmental stimuli, observed in our results, could be the result of low secretion of CRH (by pPVN) and/or of vasopressin, given that studies indicate that CRH mRNA expression (Da Costa et al., 2001; Lightman and Harbuz, 1993; Lightman and Young, 1989; Walker et al., 2001)

decreases in PVN in response to stress, and so does c-fos (Da Costa et al., 1996; Deschamps et al., 2003; Shanks et al., 1999; Woodside and Amir, 1997). The sensitivity of the anterior pituitary to CRH and/or arginine vasopressin (AVP) might also be lower as studies on lactating ewes show that plasma ACTH levels did not increase during restraint stress (Tilbrook et al., 2006). It is also possible that the activity of PVN afferents is reduced (Da Costa et al., 1996, 1997; Lightman and Young, 1989; Shanks et al., 1999; Stern and Voogt, 1973) because brain regions in charge of processing information about stressors are poorly activated (Herman et al., 2005). This is shown by experiments in which c-fos mRNA expression was lower in the amygdala, ventral lateral septum and cingulate cortex (Da Costa et al., 1996).

Under normal circumstances, noradrenergic brainstem afferents (Douglas, 2005; Flugge et al., 2004; Herman and Cullinan, 1997; Herman et al., 2003; Plotsky et al., 1989; Sawchenko et al., 2000; Sawchenko and Swanson, 1982; Stanford, 1995) stimulate the HPA axis during stressful situations, increasing the synthesis and secretion of CRH and AVP (for a review, see Douglas, 2005). Therefore, another mechanism that might contribute to a lower response of the HPA axis of lactating rats to environmental stimuli is the reduction in stimulatory noradrenergic afferents to the PVN, which alter the activity of the HPA axis (Douglas, 2005; Lightman et al., 2001; Tu et al., 2005; Walker et al., 2004).

The suckling stimulus caused by pups, or due, in part at least, to their presence, during breastfeeding, plays a key role in the maintenance of attenuated HPA axis response in lactating rats (Walker et al., 1992), although precise mechanisms have not been well established yet (Tilbrook et al., 2006). The effect of the presence of pups depends on the relevance of the stressor: in early lactation; a stressor that threatens the pups (intruder male or a predator scent) stimulates maternal HPA axis response only if the pups are present

during the stress (Deschamps et al., 2003). The response to the stressor seems to be related to fear behavior of dams with their pups, while the loss of this response in late lactation could be related to the low CRH mRNA expression the amygdala (Deschamps et al., 2003). In sheep, cortisol response to emotional stressors decreases during lactation in a more remarkably fashion if the lamb is present and is lower if the lamb can suckle (Tilbrook and Clarke, 2006; Tilbrook et al., 2006). Lactating women who have breastfed recently show attenuation of the HPA axis response to an emotional stressor (Heirichs et al., 2001, 2002).

The attenuation of the HPA axis response of lactating rats to a stressor, observed in this study, could be considered to be crucial to the dam's welfare (Slattery and Neumann, 2008) so that it can ideally take care of its offspring. Studies have shown that reduced hormone secretion in response to stress during lactation is important to prevent excess circulating levels of glucocorticoids, which may affect the normal development of pups (Altemus et al., 1995; McCormick et al., 1995; Vallee et al., 1997; Weinstock, 2001). In human beings, for instance, mothers are more susceptible to the development of mood disorders in the postpartum period (Llewellyn et al., 1997; Mastorakos and Ilias, 2000; O'Hara and Swain, 1996; Pedersen, 1999) which can last up to one year and significantly affect the newborn infant's development and the family unit.

In summary, social instigation and aggressive confrontation cause a significant reduction in hormone levels in lactating rats in the presence of their pups. On the other hand, in adult male rats, there is an increase in corticosterone secretion, thus confirming that lactation is a relevant factor in determining neuroendocrine responses to stress.

5. References

- Agrati D., Zuluaga M.J., Fernández-Guasti A., Meikle A., Ferreira A., 2008. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Horm. Behav* 53(1), 232-40.
- Albert D.J., Jonik R.H., Walsh M.L., 1992. Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal, and neural foundations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 177-192.
- Altemus M., Deuster P.A., Galliven E., Carter C.S., Gold P.W., 1995. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in lactating women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2954–2959.
- Banky Z., Nagy G.M., Halasz B., 1994. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to stress. *Neuroendocrinology* 59, 63–71.
- Brunton P.J., Russell J.A., Douglas A.J., 2008. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J. Neuroendocrinol.* 20, 764-76.
- Carter D.A., Lightman S.L., 1987. Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinemic rats. *Neuroendocrinology* 46, 532–537.
- Consiglio A.R., Lucion A.B., 1996. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 59, 591-596.
- Consiglio A.R., Bridges R.S., 2009. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behavioural Brain Research* 197, 97-102.
- Cook C.J., 1997. Oxytocin and prolactin suppress cortisol responses to acute stress in both lactating and non-lactating sheep. *J. Dairy Res.* 64, 327–339.
- Da Costa A.P.C., Wood S., Ingram C.D., Lightman S.L., 1996. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res.* 742, 177–184.
- Da Costa A.P.C., Kampa R.J., Windle R.J., Ingram C.D., Lightman S.L., 1997. Region-specific immediate-early gene expression following the administration of corticotropin-releasing hormone in virgin and lactating rats. *Brain Res.* 770, 151-162.

- Da Costa A.P., Ma X., Ingram C.D., Lightman S.L., Aguilera G., 2001. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 91, 119–130.
- De Almeida R.M.M., Lucion A.B., 1997. 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdale nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134, 392–400.
- De Almeida R.M.M., Miczek K.A., 2002. Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement (“frustration”) in mice: inhibition by anpirtoline – a 5-HT1B receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 272, 171-181.
- Deschamps S., Woodside B., Walker C.D., 2003. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *J. Neuroendocrinol.* 5, 486-97.
- Douglas A.J., Johnstone H., Landgraf R., Russell J.A., Neumann I.D., 1998. The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats. *J. Endocrinol.* 158, 285-293.
- Douglas A.J., Meddle S.L., Toschi N., Bosch O.J., Neumann I.D., 2005. Reduced activity of the noradrenergic system in the paraventricular nucleus at the end of pregnancy: implications for stress hyporesponsiveness. *J. Neuroendocrinol.* 17, 40-48.
- Erskine M.S., Barfield R.J., Goldman B.D., 1978. Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav. Biol.* 23, 206-218.
- Factor E.M., Mayer A.D., Rosenblatt J.S., 1990. Preventing suckling induced release of oxytocin does not inhibit maternal aggression in lactating rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 652, 423-424.
- Febo M., Shields J., Ferris C.F., King J.A., 2009. Oxytocin modulates unconditioned fear response in lactating dams: an fMRI study. *Brain Res.* 1302, 183-93.
- Ferreira A., Dahlof L.G., Hansen S., 1987. Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav. Neurosci.* 101, 709–17 see also p. 746
- Fischer D., Patchev V.K., Hellbach S., Hassan A.H.S., Almeida O.F.X., 1995. Lactation as a Model of Naturally Reversible Hypercorticalism Plasticity in the Mechanisms Governing Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Activity in Rats. *J. Clin. Invest.* 96, 1208-1215.

- Fish, E.W., Faccidomo S., Miczek K.A., 1999. Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 146, 391-399.
- Flugge G., van Kampen M., Mijster M.J., 2004. Perturbations in brain monoamine systems during stress, *Cell Tissue Res.* 315, 1–14.
- Gamallo A., Villanua A., Trancho G., Fraile A., 1986. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol. Behav.* 36, 217–21.
- Haller J., Barna I., Baranyi M., 1995. Hormonal and metabolic responses during psychosocial stimulation in aggressive and nonaggressive rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 65-74.
- Hansen S (1989) Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. *Behav. Neurosci.* 103:1035-1046
- Heinrichs M., Meinschmidt G., Neumann I., Wagner S., Kirschbaum C., Ehlert U., Hellhammer D.H., 2001. Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4798–4804.
- Heinrichs M., Neumann I., Ehlert U., 2002. Lactation and stress: protective effects of breast-feeding in humans. *Stress* 5, 195–203.
- Herman J.P., Cullinan W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Trends Neurosci.* 20, 78–84.
- Herman J.P., Figueiredo H., Mueller N.K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M.M., Choi D.C., Cullinan W.E., 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness, *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151–180.
- Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 29, 1201–1213.
- Higuchi T., Honda K., Takano S., Negoro H., 1988. Reduced oxytocin response to osmotic stimulus and immobilization stress in lactating rats. *J. Endocrinol.* 116, 225–230.
- Higuchi T., Negoro H., Arita J., 1989. Reduced responses of prolactin and catecholamine to stress in the lactating rat. *J. Endocrinol.* 122, 495–498.
- Higuchi T., Honda K., Takano S., Negoro H., 1992. Abolition of prolactin surge induced by ovarian steroid hormones in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 56, 234-239.

- Hucklebridge F.H., Nowell N.W., 1974. Plasma catecholamine response to physical and psychological aspects of fighting in mice. *Physiol. Behav.* 13, 35–40.
- Johnstone H.A., Wigger A., Douglas A.J., Neumann I.D., Landgraf R., Seckl J.R., Russell J.A., 2000. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 12, 811-822.
- Kammerer M., Adams D., Castelberg B.V.B., Glover V., 2002. Pregnant women become insensitive to cold stress. *BMC Pregnancy Childbirth* 2:8.
- Kehoe L., Janik J., Callahan P., 1992. Effects of immobilization stress on tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neuronal activity and prolactin levels in lactating and non-lactating female rats. *Life Sci.* 50, 55-63.
- Kolonie J.M., Stern J.M., 1995. Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Horm. Behav.* 29, 492-518.
- Koolhaas J.M., Meerlo P., De Boer S.F., Strubbe J.H., Bohus B., 1997. The Temporal Dynamics of the Stress Response *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Vol. 21, 775–782.
- Kudielka B.M., Kirschbaum C., 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol.* 69, 113-32.
- Lagerspetz K.M.J., Hautjarvi S., 1967. The effect of prior aggressive or sexual arousal on subsequent aggressive or sexual reactions in male mice. *Scand. J. Psychol.* 8:1-6.
- Lescoat G., Maniey J., 1976. Lactation and sensitivity to corticotropin axis to stress. *J Physiol (Paris)* 70:695–708.
- Li X., Ren L., Weng Q., Trisomboon H., Yamamoto T., Pan L., Watanabe G., Taya K., 2010. Effects of Acute Restraint Stress on Sperm Motility and Secretion of Pituitary, Adrenocortical, and Gonadal Hormones in Adult Male Rats. *Journal of Veterinary Medical Science* Jul 1. [Epub ahead of print]
- Lightman S.L., Young W.S.I., 1987. Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. *J. Physiol.* 394, 23–39.
- Lightman S.L., Young W.S.I., 1989. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 124, 2358–2364.
- Lightman S.L., Harbuz M.S., 1993. Expression of corticotropin-releasing factor mRNA in response to stress, *Ciba Found Symp.* 172, 173–187.

- Lightman S.L., Windle R.J., Wood S.A., Kershaw Y.M., Shanks N., Ingram C.D., 2001. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog. Brain Res.* 133, 111–129.
- Llewellyn A.M., Stowe Z.N., Nemeroff C.B., 1997. Depression during pregnancy and the puerperium. *J. Clin. Psychiatry* 58 (Suppl. 15), 26–32.
- Lonstein J.S., Simmons D.A., Stern J.M., 1998. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav. Neurosci.* 112, 1502-1518.
- Lonstein J.L., Gammie S.C., 2002. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26, 869-888.
- Lonstein J.S., 2005. Resolving Apparent Contradictions Concerning the Relationships Among Fear or Anxiety and Aggression During Lactation: Theoretical Comment on D’Anna, Stevenson, and Gammie. *Behavioral Neuroscience* 119(4), 1165–1168.
- Mastorakos G., Ilias I., 2000. Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period. Postpartum-related disorders. *Ann N Y Acad Sci* 900, 95–106.
- Mayer A.D., Rosenblatt J.S., 1987. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm. Behav.* 21, 253-267.
- Mayer A.D., Monroy A.M., Rosenblatt J.S., 1990. Prolonged estrogen progesterone treatment of nonpregnant ovariectomized rats: factors stimulating home-cage and maternal aggression and short-latency maternal behavior. *Horm. Behav.* 24, 342-364.
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S & Meaney MJ (1995) Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 84:55–61
- Miczek K.A., Nikulina E., Kream R.M., Carter G., Espejo E.F., 1999. Behavioral sensitization to cocaine after a brief social defeat stress: c-fos expression in the PAG. *Psychopharmacology* 141, 225–234.
- Mos J., Olivier B., 1986. RO 15-1788 does not influence postpartum aggression in lactating female rats. *Psychopharmacology* 90, 278–80.
- Myers M.M., Denenberg V.H., Thoman E., Holloway W.R., Bowerman D.R., 1975. The effects of litter size on plasma corticosterone and prolactin response to ether stress in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 19, 54–58.
- Neill J.J.D., 1970. Effects off “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87, 1192-1197.

- Neumann I.D., Johnstone H.A., Hatzinger M., Liebsch G., Shipston M., Russell J.A., Landgraf R., Douglas A.J., 1998. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J. Physiol.* 508, 289–300.
- Neumann I.D., Torner L., Wigger A., 2000. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95, 567–575.
- Neumann I.D., Toschi N., Ohl F., Torner L., Kromer S.A., 2001. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1016–1024.
- Neumann I.D., 2003. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depression and Anxiety* 17, 111–121.
- Numan M., Insel T.R., 2003. *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer-Verlag.
- O'Hara M., Swain A., 1996. Rates and risks of postpartum depression – a meta-analysis. *Int Rev Psychiatry* 8, 37–54.
- Padovan C.M., Guimarães F.S., 2004. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 77, 15-19.
- Pedersen C.A., 1999. Postpartum mood and anxiety disorders: a guide for the nonpsychiatric clinician with an aside on thyroid associations with postpartum mood. *Thyroid* 9, 691–697.
- Plotsky PM, Cunningham ET Jr, Widmaier EP (1989) Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion, *Endocr. Rev.* 10 437–458
- Potegal M., 1991. Attack priming and satiation in female golden hamsters: tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggress. Behav.* 17, 327-335.
- Potegal M., Tenbrink L., 1984. Behavior of attack-primed and attack-satiated female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Psychol.* 98, 66-75.
- Raab A., Dantzer R., Michaud B., Mormede P., Taghzouti K., Simon H., Le Moal M., 1986. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiol. Behav.* 36, 223-228.

- Sawchenko P.E., Li H.Y., Ericsson A., 2000. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog. Brain Res.* 122, 61–78.
- Sawchenko P.E., Swanson L.W., 1982. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat, *Brain Res.* 257, 275–325.
- Seggie J.A., Brown G.M., 1975. Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can J. Physiol. Pharm.* 53, 629–637.
- Shanks N., Windle R.J., Perks P., Wood S., Ingram C.D., Lightman S.L., 1999. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation. *J. Neuroendocrinol.* 11, 857–865.
- Slattery D.A., Neumann I.D., 2008. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *J. Physiol.* 586 (2), 377–385.
- Smotherman W.P., Wiener S.G., Mendoza S.P., Levine S., 1976. Pituitary-adrenal responsiveness of rat mothers to noxious stimuli and stimuli produced by pups. *Ciba Found Symp* 45, 5–25.
- Stanford S.C., 1995. Central noradrenergic neurones and stress, *Pharmacol. Ther.* 68, 297–342.
- Stern J.M., Levine S., 1972. Pituitary–adrenal activity in the postpartum rat in the absence of suckling stimulation. *Horm. Behav.* 3, 237–246.
- Stern J.M., Goldman L., Levine S., 1973. Pituitary–adrenal responsiveness during lactation in rats. *Neuroendocrinology* 12, 179–191.
- Stern J.M., Voogt J.L., 1973. Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling and lactating rats. *Neuroendocrinology* 13, 173–181.
- Takahashi L.K., Lore R.K., 1982. Intermale and maternal in adult rats tested at different ages. *Physiol. Behav.* 29, 1013–1018.
- Thoman E.B., Conner R.L., Levine S., 1970. Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 70, 364–369.
- Tilbrook A.J., Clarke I.J., 2006. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front Neuroendocrinol.* 27, 285–307.
- Tilbrook A.J., Turner A.I., Ibbott M.D., Clarke I.J., 2006. Activation of the hypothalamo-pituitary adrenal axis by isolation and restraint stress during lactation in ewes: effect of the presence of the lamb and suckling, *Endocrinology*, doi:10.1210/en2005-1632.

- Torner L., Toschi N., Nava G., Clapp C., Neumann I.D., 2002. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: Pregnancy stress in high anxiety dams: model for post partum depression involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur. J Neurosci.* 15, 1381–1389.
- Toufexis D.J., Walker C.D., 1996. Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. *Brain Res.* 737, 71–77.
- Tu M.T., Lupien S.J., Walker C.D., 2005. Measuring stress responses in postpartum mothers: perspectives from studies in human and animal populations, *Stress* 8, 19–34.
- Vallee M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S., 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17, 2626–2636.
- Veenema A.H., Torner L., Blume A., Beiderbeck D.I., Neumann I.D., 2007. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: Link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Hormones and Behavior* 51, 11–19.
- Veiga C.P., Miczek K.A., Lucion A.B., De Almeida R.M.M., 2010. Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the dorsal raphe nucleus and prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, in press.
- Walker C.D., Lightman S.L., Steele M.K., Dallman M.F., 1992. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 130, 115–125.
- Walker C.D., Trottier G., Rochford J., Lavallee D., 1995. Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. *J Neuroendocrinol.* 7, 615–622.
- Walker C.D., Tilders F.J., Burlet A., 2001. Increased colocalization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in paraventricular neurones of the hypothalamus in lactating rats: evidence from immunotargeted lesions and immunohistochemistry, *J. Neuroendocrinol.* 13, 74–85.
- Walker C.D., Deschamps S., Proulx K., Tu M., Salzman C., Woodside B., Lupien S., Gallo-Payet N., Richard D., 2004. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 364–382.
- Weinstock M., 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65, 427–451.

- Windle R.J., Wood S., Shanks N., Perks P., Conde G.L., da Costa A.P.C., Ingram C.D., Lightman S.L., 1997. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. *J Neuroendocrinol.* 9, 407–414.
- Woodside B., Amir S., 1997. Lactation reduces fos induction in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus after urethane administration in rats, *Brain Res.* 752, 319–323.
- Wotjak C.T., Kubota M., Liebsch G., Montkowski A., Holsboer F., Neumann I., Landgraf R., 1996. Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J. Neurosci.* 16, 7725-7732.
- Zayan R., 1991. The specificity of social stress. *Behav Processes* 25, 81–93.

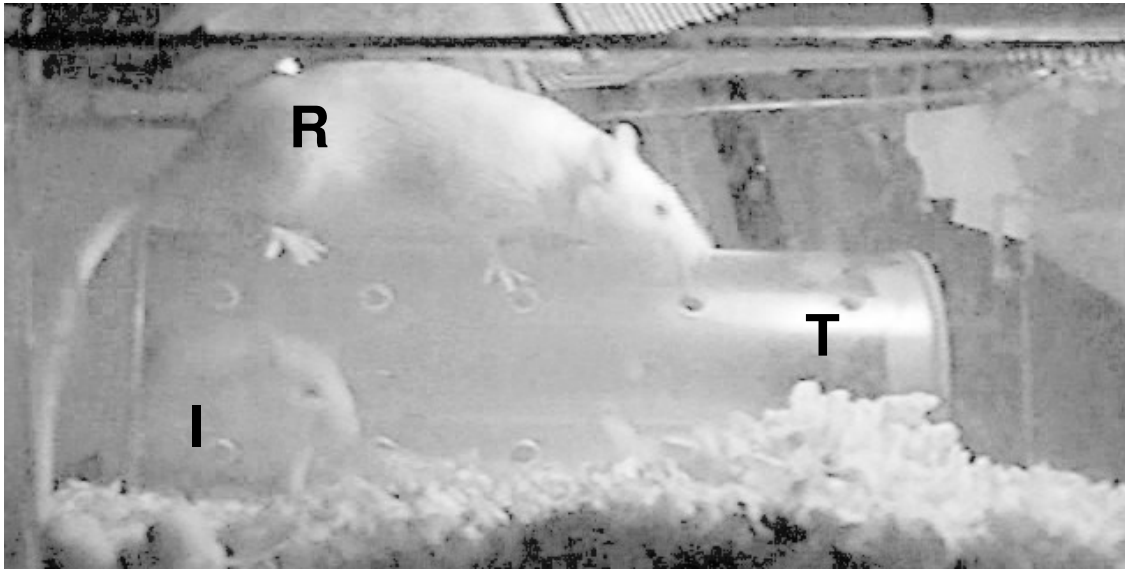


Figure 1 – Resident (R) lactating rat and stimulus rat (SR) in the acrylic tube (T) during social instigation, in the resident's box, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Hormone Measurements in Lactating Female Rats

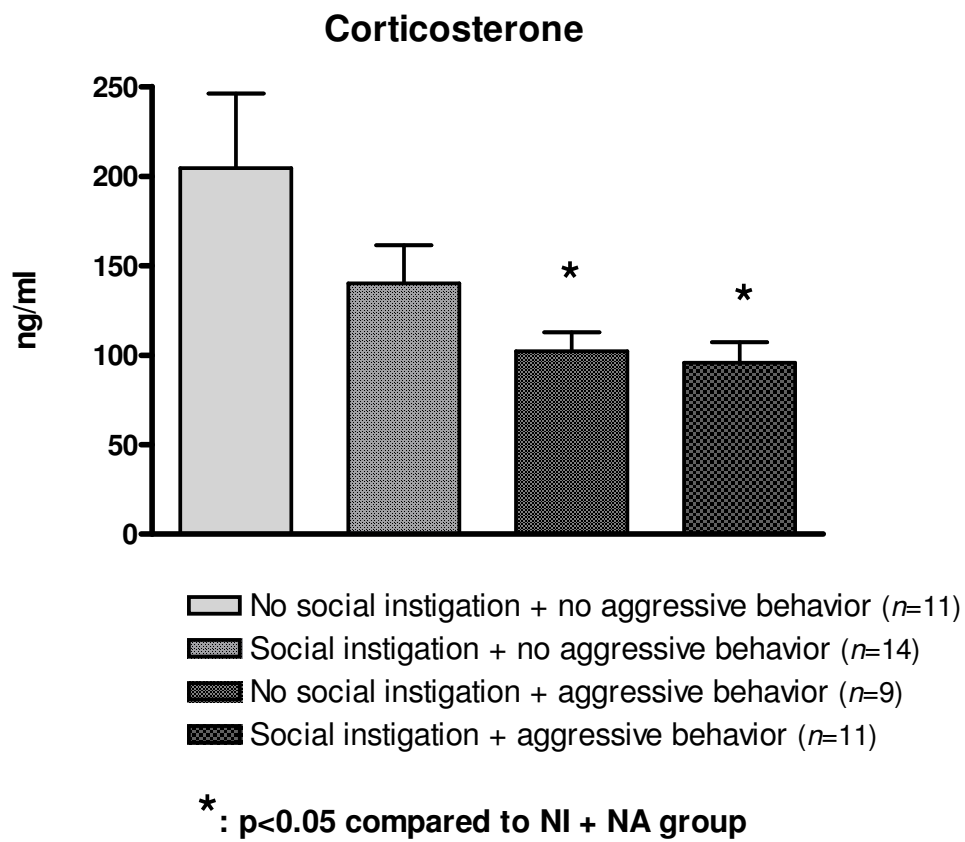


Figure 2 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma corticosterone levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

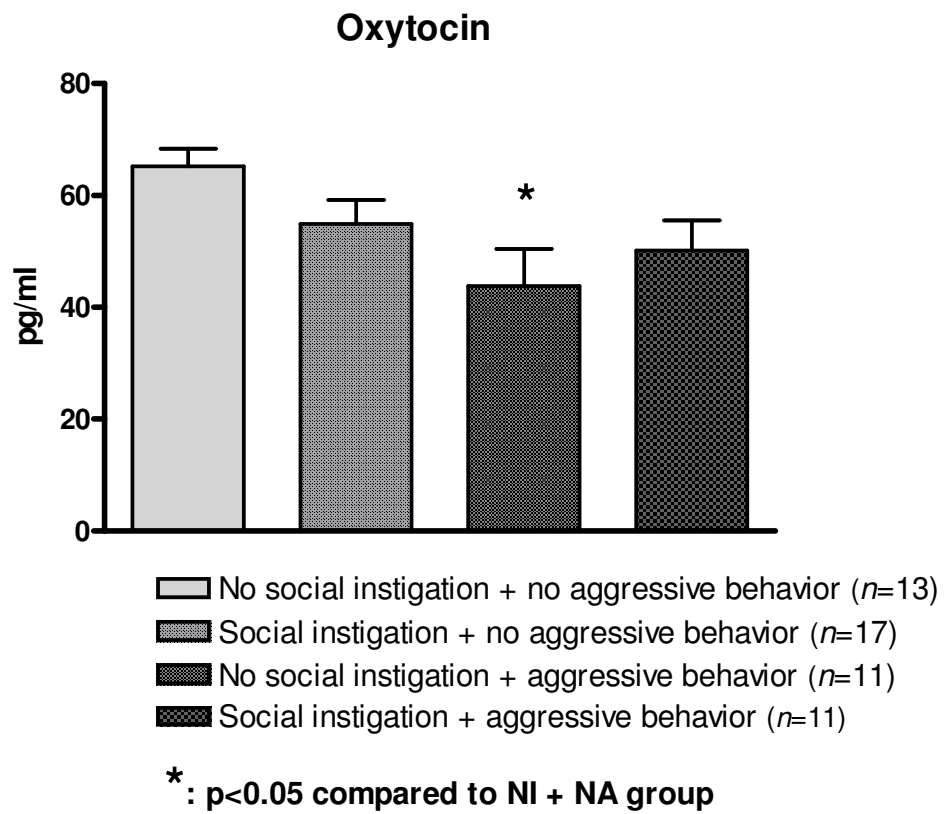


Figure 3 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma oxytocin levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

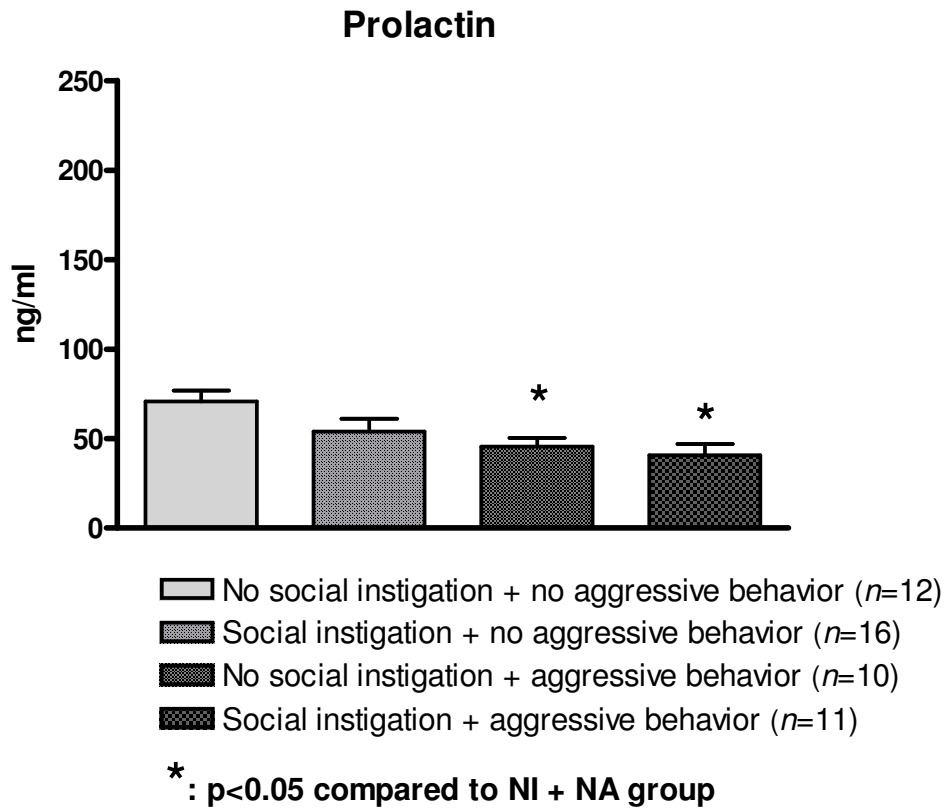


Figure 4 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma prolactin levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

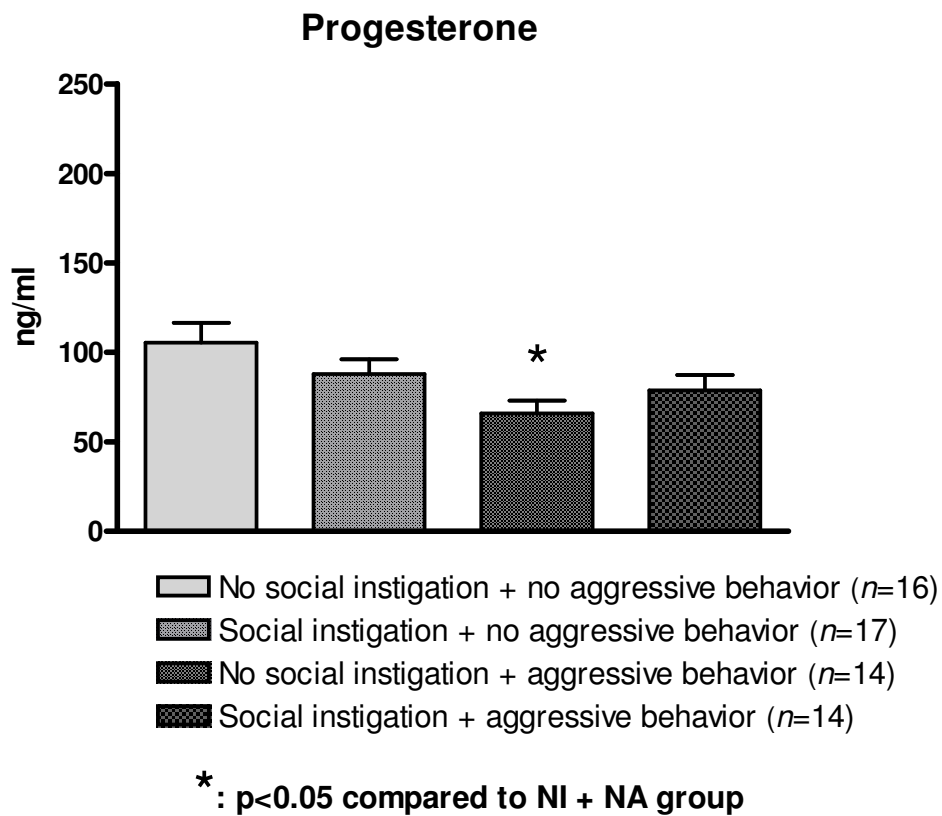


Figure 5 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma progesterone levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Maternal Aggressive Behavior

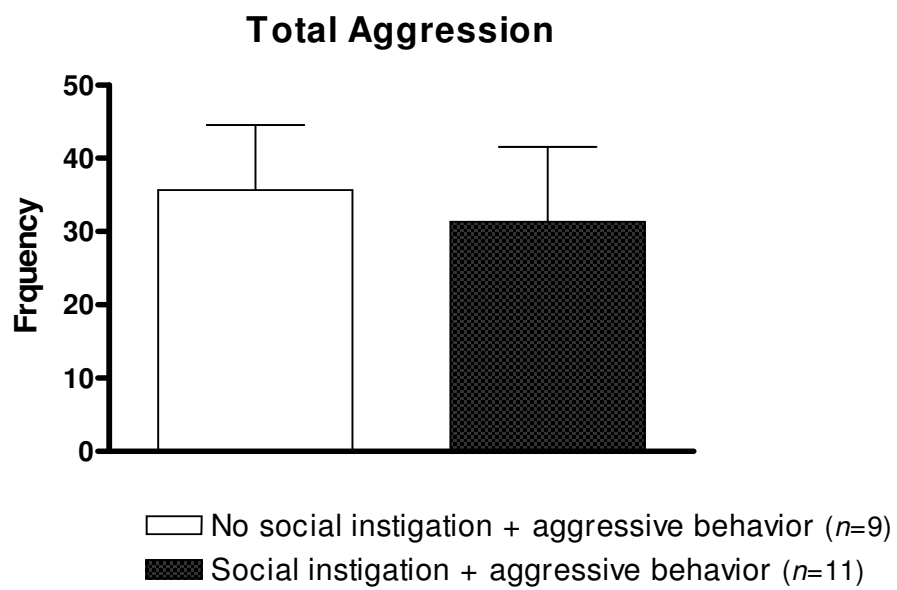


Figure 6 – Effects of social instigation on the aggressive behavior of lactating rats on postpartum day 5, in the presence of pups.

Hormone Measurements in Male Rats

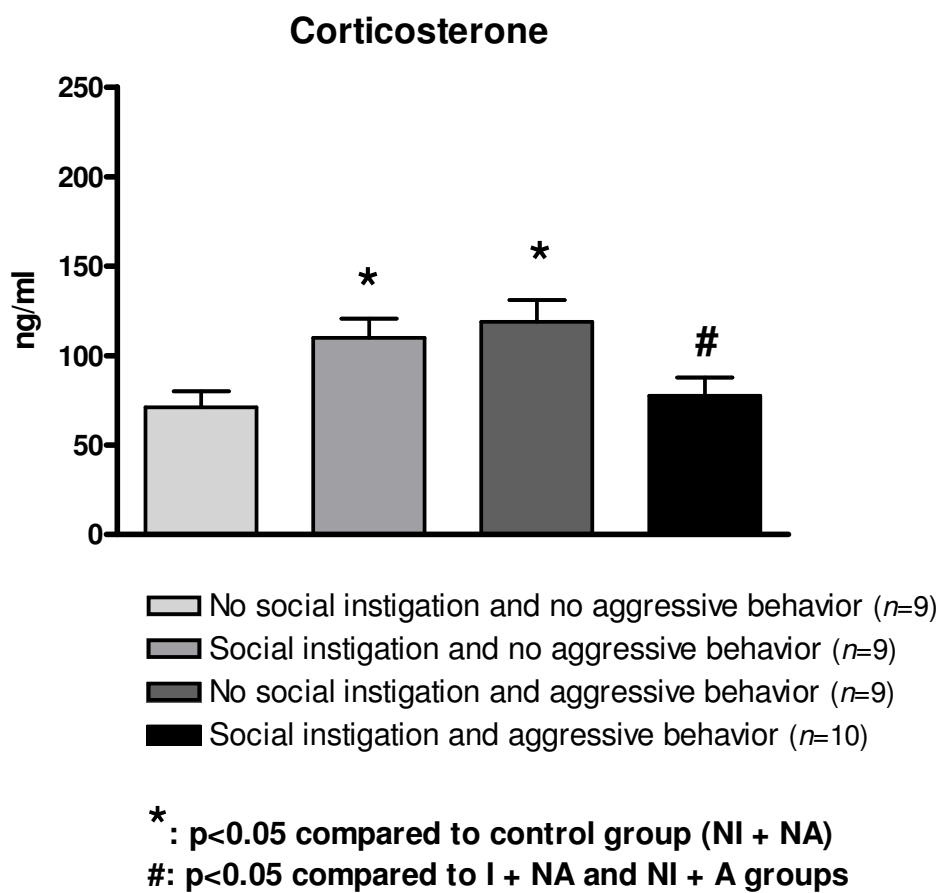


Figure 7 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma corticosterone levels in adult male rats.

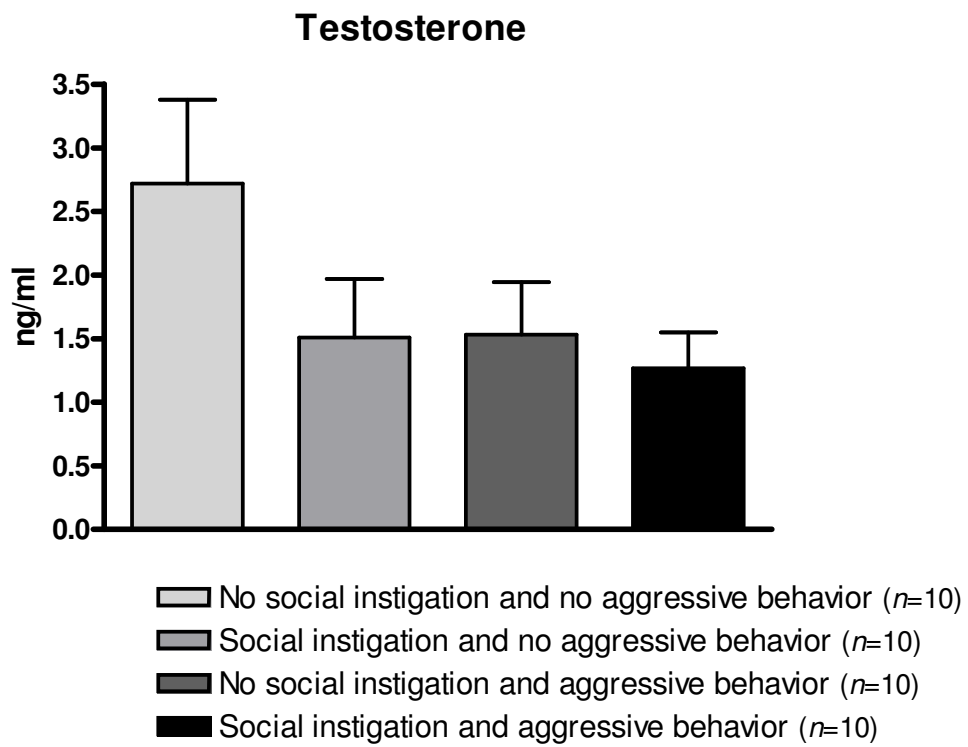


Figure 8 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma testosterone levels in adult male rats.

Table 1 – Duration (in seconds) of non-aggressive behaviors in lactating rats submitted or not to social instigation				
Behaviors	Experimental groups			
	NI + NA (n=11)	I + NA (n=14)	NI + A (n=9)	I + A (n=11)
Walking	106.8 ± 24.59	98.75 ± 22.62 ^a	178.6 ± 14.08 ^b	182.3 ± 17.33 ^b
Pup care	191.9 ± 65.62	106.1 ± 46.68	2.31 ± 1.55 ^c	3.03 ± 1.90 ^c
Rearing	39.97 ± 16.20	40.32 ± 18.20	22.79 ± 5.55	29.23 ± 7.32
Grooming	49.58 ± 15.56	139.6 ± 19.90 ^d	60.07 ± 13.59	44.66 ± 7.70

Data expressed in mean ± SEM

^a: p < 0.05, compared to I + A and NI + A groups

^b: p < 0.05, compared to NI + NA

^c: p < 0.05, compared to NI + NA group

^d: p < 0.01, compared to I + A, NI + NA and NI + A groups

Figure 1 – Resident (R) lactating rat and stimulus rat (SR) in the acrylic tube (T) during social instigation, in the resident's box, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 2 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma corticosterone levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 3 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma oxytocin levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 4 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma prolactin levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 5 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma progesterone levels in lactating rats, on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 6 – Effects of social instigation on the aggressive behavior of lactating rats on postpartum day 5, in the presence of pups.

Figure 7 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma corticosterone levels in adult male rats.

Figure 8 – Effects of social instigation and of aggressive behavior on plasma testosterone levels in adult male rats.

CAPÍTULO III

**PROVOCAÇÃO SOCIAL, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E
IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS EM RATAS
LACTANTES WISTAR**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteína Fos

Os neurônios ativados no Sistema Nervoso podem ser identificados pela expressão de Fos que é o produto de uma proteína do protooncogene *c-fos* (Hanley, 1988; Herdegen *et al.*, 1991; Knyshevski *et al.*, 2005). *C-fos* faz parte do fator de transcrição AP-1 (Kovács, 2008) e pertence a classe dos genes precoces imediatos (IEGs), juntamente com os genes *c-jun* e *c-myc* (Kovács, 2008). Estes genes são transcritos poucos minutos após uma célula eucariótica ter sido submetida a determinados estímulos (Morgan e Curran, 1991).

O conceito “acoplamento estimulação e transcrição” (Morgan e Curran, 1991) contem a sequência de eventos que ocorrem entre um estímulo externo a um neurônio e a expressão dos genes, abrangendo vários passos. Um estímulo sináptico ou humoral resulta, inicialmente, em elevação dos níveis intracelulares de cálcio, adenosina monofosfato cíclico (AMPC) ou guanosina monofosfato cíclico (GMPC), que são segundos mensageiros. Em seguida, proteínas quinases, citoplasmáticas, são ativadas e/ ou translocadas para o núcleo. Estas enzimas irão catalisar a fosforilação de fatores de transcrição constitutivos, que, por sua vez, ligam-se a seqüências consensuais de DNA de alta afinidade, na região promotora dos fatores de transcrição que podem ser induzidos (ITFs), ativando a RNA polimerase II, que por sua vez, levará a transcrição de outras proteínas (Bading *et al.*, 1993; van Dam *et al.*, 1993).

Diferentes estímulos podem induzir a expressão de *c-fos*, como: fatores neurotróficos, neurotransmissores, despolarização celular e também aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}) e elevação dos níveis intracelulares ou intranucleares de Ca^{2+} (Greenberg e

Ziff, 1984; Székely *et al.*, 1987; Morgan e Curran, 1989; Doucet *et al.*, 1990; Sheng *et al.*, 1990; Sheng e Greenberg, 1990; Ghosh *et al.*, 1994; Gaiddon *et al.*, 1996).

Na região regulatória do gene *c-fos* outros elementos também podem agir, como: o elemento de resposta ao Ca^{2+} /AMPC (CRE), elemento de resposta ao soro (SER) e o elemento sis-induzível (SIE), conferindo uma variedade de sinais sinápticos, comumente mediados por vias de transdução de sinais interdependentes, como as cascatas da proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Kovács, 1998). (Figura 1).

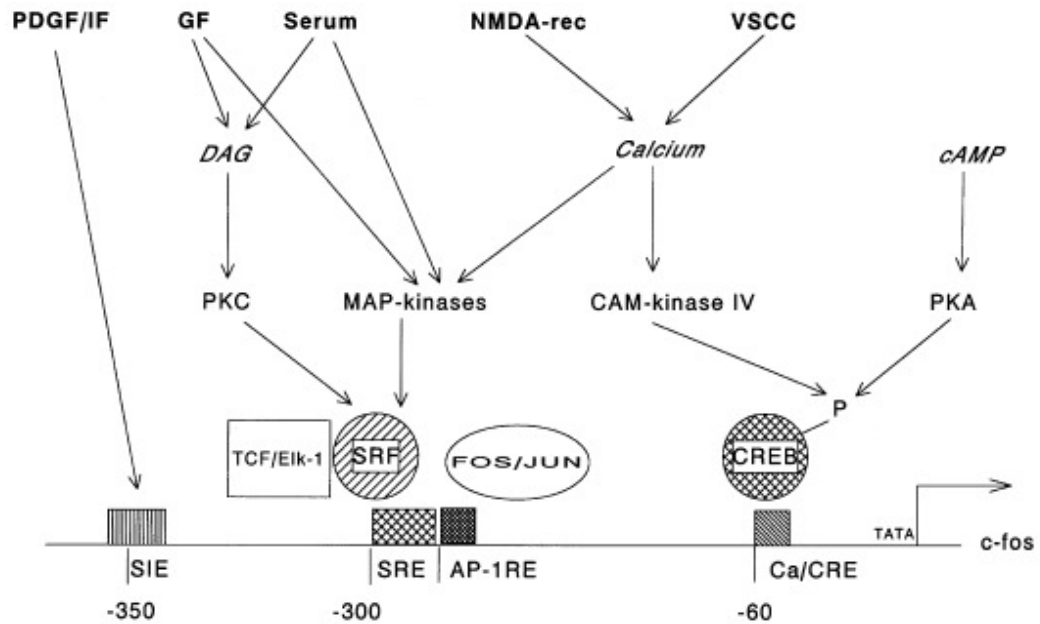


Figura 1 - Esquema representando a região regulatória do gene *c-fos*, indicando os elementos principais: o elemento de resposta ao cálcio e AMPc (Ca/CRE), o elemento de resposta do soro (SER), o sítio de ligação ativador de proteína (AP-1RE) e o elemento sis-induzível (SIE). O fator de resposta do soro, o fator complexo ternário ELK-1 (TCF/ELK-1) e a proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CREB) são alvos de diferentes sistemas de transdução, incluindo proteínas quinases A e C (PKA e PKC), proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK) e quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Outras abreviações: PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; GF, fatores de crescimento; VSCC, canal de cálcio dependente de voltagem (Reproduzido de Kovács, 1998).

A ativação de *c-fos* via CRE (elemento responsivo ao AMPc), ocorre devido ao aumento dos níveis de AMPc nos neurônios (Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Sheng *et al.*, 1990). A fosforilação rápida do CREB (proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc) via proteína quinase A (Gonzalez e Montminy, 1989) ocasiona a ativação da transcrição. A cascata da CaM quinase também fosforila o CREB e traduz mudanças nos níveis intracelulares de Ca^{2+} fazendo com que ocorra transcrição do IGE, através do mesmo CRE (de Groot e Sassone-Corsi, 1993; Bito *et al.*, 1996). Fatores de crescimento também induzem a expressão de *c-fos* através do elemento de resposta ao soro (SRE) (Treisman, 1992; Hill e Treisman, 1995).

O gene *c-fos* possui 2 canais detectores de cálcio: o canal de cálcio dependente de voltagem (VSCC), ou do Tipo-L, que induz a fosforilação do CREB via CAM quinase e causa a expressão de *c-fos* via CRE, enquanto os sinais pelo canal ligante de Ca^{2+} (receptor NMDA) resulta na ativação da transdução da MAPK e alvos SER (Bading *et al.*, 1993; Ghosh *et al.*, 1994).

CRE e SER respondem de maneira diferente ao cálcio: aumentos na concentração nuclear de cálcio controlam a expressão de *c-fos* via CRE, enquanto uma elevação citoplasmática nos níveis de Ca^{2+} controla a expressão de *c-fos* via SER, e não requer um aumento no Ca^{2+} nuclear (Hardingham *et al.*, 1997; Santella e Carafoli, 1997).

Em mamíferos, a transcrição do *c-fos* é um processo rápido e transitório, após a estimulação (Morgan e Curran, 1989; Fonta *et al.*, 1995; Harris, 1998). O RNA mensageiro (RNAm) se acumula no citoplasma por 1 a 2 horas e a proteína Fos é traduzida. Após, a proteína Fos é deslocada para o núcleo celular, através da formação de um heterodímero com a proteína c-Jun, que é necessário para a ligação ao sítio regulador AP-1, do DNA, onde age regulando a expressão de genes-alvo (Morgan e Curran, 1989; Morgan e Curran,

1991; Narranjo *et al.*, 1991 a, b; Harris, 1998). Por possuir também uma vida relativamente curta, a proteína Fos apresenta características de um sistema de sinalização (Morgan e Curran, 1989).

Sob condições basais, a detecção do RNAm para *c-fos* e os níveis de proteínas são muito baixos (Hughes *et al.*, 1992). Em regiões importantes do encéfalo, o pico de indução do RNAm para *c-fos* ocorre entre 30 e 60 minutos após um estímulo agudo e o nível máximo da proteína Fos ocorre entre 1 e 3 horas (Kovács, 1998, 2008). Em seguida, vai gradualmente desaparecendo do núcleo da célula após 4 a 6 horas do estímulo inicial (Sonnenberg *et al.*, 1989, Chan *et al.*, 1993; Imaki *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1994; Cullinan *et al.*, 1995; Kovács e Sawchenko, 1996; Kovács, 1998).

C-fos tornou-se um dos marcadores anatômicos de ativação neuronal mais amplamente utilizados no SNC, devido a uma série de fatores, como: 1) sob condições basais, ser expresso em baixos níveis no encéfalo intacto; 2) induzir uma resposta estereotipada frente a importantes sinais extracelulares (íons, neurotransmissores e fatores de crescimento); 3) sua resposta ser transitória e 4) a detecção de *c-fos* (tanto da proteína quanto do RNAm) ser simples (Kovács, 2008). Dessa forma, a análise da expressão da proteína Fos pela técnica da imunistoquímica tem sido uma ferramenta importante para o mapeamento da ativação celular (Ricci *et al.*, 2007; Knyshevski *et al.*, 2005). Experimentos utilizando uma diversidade de estímulos fisiológicos e comportamentais têm demonstrado a ativação de Fos em roedores, como: estresse por imobilização, transecção do nervo ciático, defesa social, isquemia focal e agressividade ofensiva (Ceccatelli *et al.*, 1989; Senba *et al.*, 1993; Chi *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 1991; Delville *et al.*, 2000).

1.2 C-fos e Comportamento Agressivo

Análise da expressão dos genes de ativação imediata, como c-Fos, tem sido utilizada para ajudar a compreender as bases neurais do comportamento maternal (Gammie e Nelson, 2001).

Áreas encefálicas que são importantes para o controle da agressão, como septo lateral, núcleo da estria terminal, núcleos hipotalâmicos anterior e lateral, bem como os núcleos medial, corticomédial e central da amígdala, apresentam aumento significativo de neurônios contendo Fos após interação agressiva em ratos, camundongos e hamsters machos (Kollack-Walker e Newman, 1995; Matsuda *et al.*, 1996; Potegal *et al.*, 1996 a e b; Bamshad *et al.*, 1997; Kollack-Walker *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 1999, 2000; Delville *et al.*, 2000; Gammie e Nelson, 2001; Gordon *et al.*, 2002; Halasz *et al.*, 2002; Van der Vegt *et al.*, 2003 b; Haas *et al.*, 2010, *dissertação de mestrado*).

Alguns estudos têm mostrado que, após agressão maternal, ocorre aumento na expressão de c-Fos na amígdala medial, núcleo da estria terminal, núcleo paraventricular do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (Gammie e Nelson, 2001; Stern e Gallo, 1998). Camundongos machos parentais (que cuidam dos filhotes), apresentam aumento na expressão de c-Fos na área pré-óptica medial, hipotálamo ventromedial e amígdala medial (Trainor *et al.*, 2008) e estas mesmas regiões também expressam Fos no contexto de agressão maternal (Gammie, 2005). Fos tem sido expressa somente por curtos períodos (15 a 90 minutos) após exposição a um estímulo (Gammie e Nelson, 2001; Morgan *et al.*, 1987; Morgan e Curran, 1991; Knyshevski *et al.*, 2005). Todavia, alguns estudos mostraram que a expressão de Fos pode ser persistente; representando ativação celular em resposta a

estímulos fisiológicos crônicos (Fenelon *et al.*, 1993; Myiata *et al.*, 1994) e comportamentais (Fenelon *et al.*, 1993; Matsuda *et al.*, 1996).

Halász e colaboradores (2006) demonstraram que há um aumento na expressão de Fos no córtex pré-frontal, especificamente na região VO, dentre outras regiões, após ratos machos terem sido submetidos tanto a encontros psicossociais quanto agressivos, evidenciando um possível envolvimento do córtex pré-frontal no controle da agressividade. Outro trabalho demonstrou que esta ativação foi especialmente maior em camundongos machos previamente selecionados com altos índices de agressividade (Haller *et al.* 2006).

Em relação a rafe, ocorre um aumento na expressão de Fos no núcleo dorsal e mediano, após contato psicossocial, encontro agressivo (Haller *et al.*, 2005) e estresse repetido (Chung *et al.*, 1999) em ratos machos.

Gammie e Nelson (2001) demonstraram que várias áreas encefálicas são ativadas pela proteína Fos em camundongos fêmeas lactantes e um trabalho mais recente examinou a ativação de *c-fos* no SNC de camundongos lactantes expostas ao estresse por contenção agudo e crônico (Gammie e Stevenson, 2006). Em contrapartida, há poucos dados na literatura evidenciando quais as possíveis regiões encefálicas que expressam a proteína *fos* em ratas lactantes submetidas à situações estressantes (Monasterio *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A maioria dos estudos sobre comportamento agressivo tem focado nos mecanismos fisiológicos, nas vias neurais e hormônios periféricos que controlam a expressão da agressividade em roedores machos, mas ainda são pouco conhecidos os mecanismos neurais acerca do comportamento agressivo maternal. A utilização de marcadores de ativação neuronal, através da técnica de imunistoquímica para a proteína Fos, tem se mostrado uma boa ferramenta para análise de uma subregião de células ativas durante a execução de determinado comportamento. Devido ao fato de que ainda não há trabalhos demonstrando as regiões encefálicas que expressam aumento na imunorreatividade à c-Fos em lactantes submetidas a protocolos experimentais de agressividade escalada, como a provocação social, o objetivo deste estudo foi avaliar a ativação da região VO PFC e DRN através da expressão de c-Fos, em ratas lactantes submetidas à provocação social e/ ou comportamento agressivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a provocação social altera a expressão de c-Fos em ratas lactantes submetidas à provocação social no VO PFC;
- Verificar se a provocação social altera a expressão de c-Fos em ratas lactantes no DRN;

- Verificar se o comportamento agressivo altera a expressão de c-Fos em ratas lactantes submetidas à provocação social no VO PFC;
- Verificar se o comportamento agressivo altera a expressão de c-Fos em ratas lactantes submetidas à provocação social no DRN;
- Verificar se a provocação social e o comportamento agressivo alteram a expressão de c-Fos em ratas lactantes submetidas à provocação social no VO PFC e no DRN.

ARTIGO 3

EXPRESSÃO DE C-FOS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NÚCLEO DORSAL DA
RAFE MESENCEFÁLICA EM RATAS LACTANTES SUMETIDAS À PROVOCAÇÃO
SOCIAL

Artigo a ser submetido para publicação na revista Brain Research

EXPRESSÃO DE C-FOS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E NÚCLEO DORSAL DA RAPE MESENCEFÁLICA EM RATAS LACTANTES SUBMETIDAS À PROVOCAÇÃO SOCIAL

Caroline Perinazzo da Veiga^a; Elisa Winkelmann-Duarte^b, Eloisa Pavesi^c, Simone Mattos Louzada^d, Klaus A. Miczek^e, Aldo Bolten Lucion^f, Rosa Maria Martins de Almeida^g

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bDepartamento de Ciências Morfológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC, Brazil

^dLaboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eDepartments of Psychology, Pharmacology, Neuroscience and Psychiatry, Tufts University, Medford and Boston, USA.

^fDepartamento de Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^gInstituto de Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento.

Corresponding author:

Rosa Maria Martins de Almeida
Instituto de Psicologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Bairro Santa Cecília
Porto Alegre - RS – Brasil
CEP 90035-003 - Fone: +55 (51) 3308-5066 – Fax: +55 (51) 3308-5470
e-mail: rosa_almeida@yahoo.com or rosa.almeida@ufrgs.br

Abstract

Fêmeas são frequentemente menos agressivas que os machos, todavia, durante a lactação elas apresentam altos níveis de comportamentos agonísticos, contra um intruso na área do ninho, sendo que este comportamento é denominado agressão maternal. Em ratos, o comportamento agressivo maternal ocorre com mais frequência do 3º ao 12º dia pós-parto e durante este período as fêmeas apresentam cuidado intenso direcionado aos seus filhotes. A provocação social é um protocolo experimental utilizado para elevar os níveis de agressividade típicos da espécie. Neste estudo, nós utilizamos a provocação social para analisar a expressão de um marcador de atividade neuronal – c-Fos. Ratas lactantes no quinto dia pós-parto, na presença dos seus filhotes, foram divididas em quatro grupos experimentais: não provocadas e sem comportamento agressivo (1); provocadas e sem comportamento agressivo (2); não provocadas e com comportamento agressivo (3) e provocadas e com comportamento agressivo (4). Após 60 minutos do término do teste de agressividade, foi realizada a técnica da imunistoquímica para c-Fos e duas regiões encefálicas foram avaliadas: a região ventro-orbital do córtex pré-frontal (VO PFC) e o núcleo dorsal da rafe (DRN). Nossos resultados mostraram que ratas provocadas e com comportamento agressivo aumentam a expressão de Fos no VO PFC quando comparadas

com o grupo controle (não provocadas e sem agressivo), mas no DRN não houve alteração na imunorreatividade de Fos. Dessa forma, estes resultados complementam resultados prévios com microinjeção de agonistas 5-HT_{1B} nesta mesma região, comprovando que o VO PFC é uma região importante na modulação do comportamento agressivo maternal.

Palavras chave: provocação social, agressão maternal, c-Fos, córtex pré-frontal, núcleo dorsal da rafe.

1. Introdução

O repertório comportamental das fêmeas durante a maternidade muda drasticamente, quando comparado com outros períodos do ciclo reprodutivo (Ferreira et al., 2002). A maternidade implica em mudanças na percepção das mães em relação aos filhotes (Kinsley e Bridges, 1990; Rosenblatt, 1975), que não assegura apenas um vínculo de ligação das mães com a ninhada, mas também causa mudanças importantes na resposta das mães em relação à estímulos do meio (Agrati et al., 2008). Fêmeas são frequentemente menos agressivas que os machos, todavia, durante a lactação elas apresentam altos níveis de comportamentos agonísticos, contra um intruso na área do ninho (Bridges, 1996; Erskine et al., 1980; Giovenardi et al., 2000; Olivier e Yuong, 2002; Lonstein e Gammie, 2002). Em ratos, o comportamento agressivo maternal ocorre com mais frequência do 3º ao 12º dia pós-parto e durante este período as fêmeas apresentam cuidado intenso direcionado aos seus filhotes (Consiglio e Bridges, 2009; Erskine et al., 1978).

A provocação social é um dos protocolos experimentais utilizados para aumentar o comportamento agressivo, pois níveis excessivos de comportamento agressivo podem ser induzidos em animais de laboratório. Camundongos, ratos e hamsters iniciam ataques com uma latência muito baixa e com frequência elevada, quando testados com um intruso na sua caixa-residência ou em um local não familiar, após terem sido provocados previamente por um oponente (De Almeida e Miczek, 2002; Fish *et al.*, 1999; Potegal, 1991). Nosso grupo de pesquisas mostrou recentemente, que ratas lactantes aumentam de forma significativa os níveis de agressividade, quando submetidas à provocação social (Veiga *et al.*, 2010).

Análise da expressão dos genes de ativação imediata, como c-Fos, tem sido utilizada para ajudar a compreender as bases neurais do comportamento maternal (Gammie e Nelson, 2001). Em camundongos, confrontos agressivos induzem ativação de c-Fos no córtex pré-frontal (PFC) (Halász *et al.*, 2006; Haller *et al.*, 2006). A região ventro-orbital do PFC (VO PFC) tem sido identificada como uma área importante para o controle inibitório de circuitos subcorticais que medeiam o comportamento agressivo e impulsivo (Blair, 2001, 2004; Cardinal *et al.*, 2004; Kheramin *et al.*, 2005; Séguin, 2004; Veiga *et al.*, 2007). Outra região que tem sido implicada na modulação da agressão maternal é o núcleo dorsal da rafe (DRN), pois trabalhos do nosso grupo de pesquisas demonstraram recentemente que a microinjeção de um agonista dos receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT, aumentou o comportamento agressivo maternal (Veiga *et al.*, 2010).

Levando-se em consideração que a maioria dos estudos sobre agressividade tem focado nos mecanismos fisiológicos (Davis e Marler, 2004), mas ainda são pouco conhecidos os mecanismos neurais acerca do comportamento agressivo maternal (Consiglio *et al.*, 2005, De Almeida e Lucion, 1997; Factor *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1987; Hansen e Ferreria, 1986, Giovenardi *et al.*, 1998; Insel, 1986; Lonstein e Gammie, 2002; Nelson e

Trainor, 2007, Russel e Leng, 1998, Svare, 1990), o objetivo deste estudo foi avaliar a ativação da região VO PFC e DRN através da expressão de c-Fos, em ratas lactantes submetidas à provocação social e/ ou comportamento agressivo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

Para a realização destes experimentos, foram utilizadas ratas lactantes Wistar primíparas provenientes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, com aproximadamente 90 dias de idade. Cada fêmea foi colocada e mantida individualmente em caixas de acrílico transparentes (46cm×31cm×17 cm), com acesso livre à água e comida. A data do parto foi controlada, sendo que o dia do nascimento dos filhotes foi estabelecida como data 0 (PPD 0). No PPD 1, os filhotes foram padronizados em 8 por ninhada, independente do sexo dos animais. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura controlada ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo claro e escuro de 12:12 horas, com a luz apagando às 18 h). Para testar o comportamento agressivo das fêmeas lactantes, foram usados machos intrusos (Intr) com aproximadamente 150 g. Também foram utilizados machos instigadores (Inst), os quais foram protegidos por um tubo de acrílico e não tiveram um confronto direto com as residentes. Intr e Inst foram mantidos em grupos de 5 animais por caixa. Os Inst nunca foram usados como Intr. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição.

2.1.1 Confronto residente intruso

No PPD 3, as fêmeas foram selecionadas para o comportamento agressivo (conforme Veiga et al., 2010). O teste comportamental foi realizado na caixa da fêmea residente, na presença dos filhotes, no início do período escuro.

2.1.2 Provocação social

A provocação social foi realizada no PPD 5 (Figura 1). A provocação social consiste na colocação de um tubo de acrílico que possui orifícios (28 cm de comprimento, 10 cm de diâmetro) contendo um macho oponente (instigador), por 5 min na caixa da fêmea residente. As residentes tipicamente ameaçam o instigador que está protegido e atacam o tubo cilíndrico perfurado. Os filhotes permaneceram na caixa com suas mães durante a provocação social.

2.1.3 Comportamento agressivo maternal

5 min após o término da provocação social (ainda no PPD 5) , foi realizado o comportamento agressivo maternal, contra um macho intruso, por 10 min. O repertório comportamental analisado posteriormente, foi descrito previamente por De Almeida e Lucion (1997). A provocação social e o comportamento agressivo maternal foram filmados e posteriormente analisados por experimentador usando o software The Observer (version 3.0, Noldus, The Netherlands).

Os comportamentos agressivos foram analisados através das frequências de ataque lateral, mordidas no corpo do intruso e postura agressiva.

As ratas lactantes foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

1) Não-provocadas e sem comportamento agressivo (NP + SA) – o tubo de acrílico foi colocado na caixa residente vazio (sem o instigador) e as ratas não foram submetidas ao comportamento agressivo maternal;

2) Provocadas e sem comportamento agressivo (P + SA) – o tubo de acrílico foi colocado na caixa residente com o instigador e as ratas não foram submetidas ao comportamento agressivo maternal;

3) Não-Provocadas e com comportamento agressivo (NP + CA) - o tubo de acrílico foi colocado na caixa residente vazio (sem o instigador) e as ratas foram submetidas ao comportamento agressivo maternal;

4) Provocadas e com comportamento agressivo (P + CA) - o tubo de acrílico foi colocado na caixa residente com o instigador e as ratas foram submetidas ao comportamento agressivo maternal.

2.2 Imunoistoquímica para expressão da imunorreatividade à proteína Fos

No PPD 5, 80 minutos após o início da provocação social, as ratas dos 4 grupos experimentais foram estudadas para a detecção da proteína Fos no VO PFC e no DRN. O grupo controle (não provocadas e sem comportamento agressivo) não teve nenhuma intervenção até o início desta etapa experimental. Simultaneamente, as ratas foram profundamente anestesiadas com tiopental sódico (50 mg/kg, ip), para que a perfusão transcardíaca fosse realizada (injetado 150 ml de solução salina, seguido de paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4; 150 ml). Em seguida, os encéfalos foram removidos e permaneceram em solução fixadora (paraformaldeído 4%) por 8 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os encéfalos foram crioprotetidos, em solução de sacarose a 30% a 4°C. A seguir, os encéfalos foram

seccionados em cortes coronais de 50 μm de espessura no criostato, sendo coletados *freefloating*. Os cortes foram mantidos imersos em solução anticongelante (contendo PBS, água destilada, sacarose, propilenoglicol, Vetec, Brasil) e armazenados em freezer a -70 °C até o dia da imunoistoquímica para Fos. Todos os encéfalos foram processados juntos para a detecção da proteína Fos utilizando o método avidina-biotina-peroxidase, conforme Cezario et al. (2008). Os cortes dos encéfalos foram lavados por 3 vezes, durante 10 minutos cada, em tampão PBS e incubados em solução de tampão com Triton X-100 (Sigma Chemicals Company, EUA), soro normal de cabra e anticorpo anti-Fos feito em coelho (Ab-5; Calbiochem, USA) em uma diluição de 1:20.000 durante 48h a 4°C e sob agitação contínua. Após esse período, os cortes foram incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente em uma solução de 1:250 de anticorpo biotilado IgG de cabra anti-coelho (Vector Laboratories, USA) e depois foram misturados numa solução contendo complexo de avidina-biotina peroxidase na diluição de 1:250 (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, EUA) durante o mesmo período de tempo. A visualização do complexo da peroxidase foi observada durante exposição de 10 minutos em uma solução de cromógeno contendo 0,02% 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemicals Company, EUA) com 0,3% de sulfato de níquel em 0,05 M de tampão Tris (pH 7,6), seguida pela incubação durante 5 minutos de uma solução 0,01% de glicose oxidase (Glicose Oxidase Tipo VII de *Aspergillus Niger*, Sigma Chemicals Company, EUA) e 10% de p-D-glicose (Sigma Chemicals Company, Saint Louis, EUA) para produzir um produto azul escuro. Para o controle negativo da atividade enzimática, alguns cortes foram randomicamente processados omitindo-se o anticorpo primário. Em seguida, todos os cortes foram lavados com tampão, coletados em lâminas previamente gelatinizadas, desidratados em etanol,

clarificados com xilol e montados com lamínulas utilizando DPX (*distyrene/plasticizer/xylene*).

2.2 Quantificação de células Fos-positivas

A região VO PFC e o DRN foram identificados de acordo com o atlas do encéfalo de ratos (Paxinos e Watson, 1998). Para a quantificação das células marcadas imunistoquimicamente para proteína Fos, foi utilizado um microscópio (Zeiss Axioscop2) com uma lente de 20 X e uma câmara de vídeo (CCD vídeo camera module) acoplada a um computador (Apple Macintosh 8600-300) e um sistema para análise de imagem (NIH Image 1.62f). A contagem dos neurônios de cada região foi realizada utilizando-se ambos os hemisférios, direito e esquerdo (conforme Davis e Marler, 2004; Madruga et al., 2006) e com o auxílio de uma área teste ($13887 \mu\text{m}^2$) de acordo com a publicação de trabalhos prévios para a expressão de c-Fos em roedores (Davis e Marler, 2004; Gammie e Nelson, 2001). Foram contados os neurônios que encontravam-se dentro desta área teste e aqueles que posicionavam-se sobre duas linhas previamente definidas como linhas permitidas. Os neurônios que incidiam sobre as duas outras linhas (linhas proibidas) não foram contados (Camozzato et al., 2009; Wilkelmann-Duarte et al., 2007). Os cortes de cada região foram realizados ao longo de toda a sua extensão, com um intervalo de 200 μm . Para o VO PFC, os cortes estavam entre 3,70 a 5,20 mm anterior ao bregma e para o DRN, os cortes estavam entre 8,0 e 7,04 mm posterior ao bregma (Paxinos e Watson, 1998). Em relação ao DRN, a quantificação celular indicava a soma da região proximal e distal (tomando-se com referência o aqueduto). Os dados representam a média do número de neurônios de cada região dentro da área teste. Toda a quantificação das células marcadas foi realizada por dois experimentadores, alheios ao estudo.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM. Os resultados da imunorreatividade à proteína Fos das regiões analisadas (VO PFC e DRN) dos 4 grupos experimentais (NP + SA, P + SA, NP + CA e P + CA) foram analisados usando ANOVA de uma via. Quando houve uma diferença estatisticamente significativa, com um $p < 0,05$, Newman Keuls foi utilizado como um post hoc. Os comportamentos agressivos das fêmeas dos dois grupos submetidos ao teste de agressividade (NP + CA e P + CA) foram analisados usando o Teste *t de Student*, seguido de Mann Whitney, quando houve uma diferença estatisticamente significativa, com um $p < 0,05$.

3. Resultados

Em relação à expressão da proteína Fos no VO PFC, a análise microscópica mostrou que ratas lactantes provocadas e submetidas ao comportamento agressivo apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de células Fos positivas ($F(3,17)=3.30$; $p < 0.05$; Figuras 2 e 3), quando comparadas com o grupo controle (não provocadas e sem comportamento agressivo).

Quanto à expressão da proteína Fos no DRN, não houve diferenças estatisticamente significativas, no número de células Fos positivas, quando os grupos foram analisados entre si ($F(3,16)=0.64$; $p=0.5$; Figuras 4 e 5).

Ratas lactantes provocadas socialmente e submetidas ao comportamento agressivo apresentam um aumento estatisticamente significativo na frequência de ataques laterais

($t_9=2.43$; $p<0.04$; Figura 6) quando comparadas com o grupo não provocadas e com comportamento agressivo.

4. Discussão

Os experimentos demonstram que ratas lactantes, no quinto dia pós-parto, submetidas à provocação social e comportamento agressivo, contra um macho intruso, na presença dos filhotes, aumentam a expressão da imunorreatividade à proteína Fos (Fos-Ir) especificamente na região VO do PFC. Por outro lado, não houve alteração na expressão de Fos no DRN das lactantes, após exposição à provocação social ou teste de agressividade. Análises de aumento na expressão de fatores de transcrição, como c-Fos, em associação com um comportamento específico (por exemplo, agressão maternal) apontam evidências indiretas importantes de atividade neural de uma subregião de células durante a execução de determinado comportamento (Gammie e Nelson, 2001).

Ainda não há trabalhos demonstrando as regiões encefálicas que expressam aumento na Fos-Ir em lactantes submetidas a protocolos experimentais de agressividade escalada, como a provocação social. Alguns estudos têm mostrado que, após agressão maternal, ocorre aumento na expressão de c-Fos na amígdala medial, núcleo da estria terminal, núcleo paraventricular do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (Stern e Gallo, 1998; Gammie e Nelson, 2001). Camundongos machos parentais (que cuidam dos filhotes), apresentam aumento na expressão de c-Fos na área pré-óptica medial, hipotálamo ventromedial e amígdala medial (Trainor et al., 2008) e estas mesmas regiões também expressam Fos no contexto de agressão maternal (Gammie, 2005). Fos tem sido expressa

somente por curtos períodos (15 a 90 minutos) após exposição a um estímulo (Morgan et al., 1987; Morgan e Curran, 1991; Gammie e Nelson, 2001; Knyshevski et al., 2005). Todavia, alguns estudos mostraram que a expressão de Fos pode ser persistente; representando ativação celular em resposta a estímulos fisiológicos crônicos (Fenelon et al., 1993; Myiata et al., 1994) e comportamentais (Fenelon et al., 1993; Matsuda et al., 1996).

Experimentos realizados com ratos machos mostraram que em relação às regiões VO e LO do córtex pré-frontal, ocorre um aumento na ativação neuronal após encontro agressivo (Hálasz et al., 2006) e esta ativação foi especialmente maior em camundongos machos previamente selecionados com altos índices de agressividade (Haller et al. 2006). Dessa forma, os resultados de aumento na expressão de Fos na região VO PFC, demonstrados nos nossos experimentos, são semelhantes aos dados encontrados na literatura.

As manifestações anormais de comportamento agressivo estão relacionadas ou são causadas, por prejuízos na atividade do córtex pré-frontal (Damasio et al., 1994; Volkow et al., 1995; Golden et al., 1996; Critchley et al., 2000; Davidson et al., 2000; Hawkins et al., 2000; Bassarath, 2001; Best et al., 2002; Veit et al., 2002; Blair, 2004; Hálasz et al., 2006). Contrastando com estes resultados, foi encontrado em nossos experimentos que a provocação social seguida de comportamento agressivo aumentou a ativação neuronal na região VO do PFC, sendo que outros trabalhos também têm mostrado resultados semelhantes (Hálasz et al., 2006; Haller et al. 2006). Hálasz et al. (2006) afirmam que esta discrepância, em relação à deficiência do PFC em seres humanos que apresentam comportamento violento e déficits não encontrados em roedores, pode ser explicada devido as diferenças existentes entre o funcionamento agudo e crônico do PFC. Por exemplo, poderia ser hipotetizado que ativações agudas (como no nosso trabalho) e deficiente

funcionamento crônico (pessoas violentas) afetam o comportamento agressivo por mecanismos independentes. Deficiência no PFC tem mostrado uma alteração no julgamento moral em seres humanos e acredita-se que distúrbios comportamentais ocorram através desta via (Price et al., 1990; Nichelli et al., 1995; Greene et al., 2004; Luo et al., 2006). Assim, déficits do pré-frontal conduzem a violência via deficiência no julgamento moral (Hálasz et al., 2006). Em contraste, a ativação aguda do PFC pode contribuir para a expressão do comportamento agressivo. Esta questão é suportada pelos resultados encontrados neste trabalho e por outros estudos também em roedores (Hálasz et al., 2006).

Podemos inferir que as células fos-positivas no DRN sejam neurônios serotoninérgicos, pois de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisas, foi demonstrado que a microinjeção do agonista dos receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT no DRN aumentou o comportamento agressivo de lactantes (Veiga et al., 2010) e que possivelmente esteja ocorrendo uma redução de serotonina nesta área. Uma análise mais detalhada utilizando imunistoquímica para c-fos com co-localização para os neurônios serotoninérgicos poderia dar mais suporte aos resultados obtidos neste trabalho.

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstram que ratas lactantes provocadas socialmente e submetidas ao comportamento agressivo, no PPD 5, na presença dos filhotes, aumentam a Fos-Ir no VO PFC, mas que no DRN não ocorre alteração na expressão da proteína Fos. Experimentos futuros com imunistoquímica para proteína Fos em ratas lactantes provocadas socialmente e submetidas ao comportamento agressivo são imprescindíveis para análise de outras regiões encefálicas que estejam envolvidas com a modulação ou expressão da agressividade maternal, para um estudo mais detalhado da circuitaria envolvida neste comportamento.

5. Referências bibliográficas

- Agrati D, Zuluaga MJ, Fernández-Guasti A, Meikle A, Ferreira A (2008) Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Horm Behav* 53(1):232-40
- Bassarath L (2001) Neuroimaging studies of antisocial behavior. *Can J Psychiatr* 46:728-32
- Best M, Williams JM, Coccaro EF (2002) Evidence for a dysfunctional prefrontal circuit in patients with an impulsive aggressive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8448-53
- Blair RJ (2001) Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:727-731
- Blair JR (2004) The roles of orbital frontal cortex in the modulation of antisocial behavior. *Brain and Cognition* 55:198-208
- Bridges R (1996) Biochemical basis of paternal behavior in the rat. In: Rosenblatt JS, Snowdon CT, editors. *Parental care: evolution, mechanisms and adaptive significance*. New York: Academic Press p.215-42
- Camozzato TS, Winkelmann-Duarte EC, Padilha CB, Miguel SP, Bonzanini L, Anselmo-Franci JA, Fernandes MC, Lucion AB (2009) Neonatal handling reduces the number of cells in the medial preoptic area of female rats. *Brain Res* 247:92-9
- Cardinal RM, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1021:33-50
- Cezario AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS (2008) Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal preammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. *Eur J Neurosci* 28:1003-1015
- Consiglio AR, Borsoi A, Pereira G, Lucion AB (2005) Effects of oxytocin microinjected into different areas of the central nervous system on maternal aggressive behavior. *Physiol Behav* 85:354-62
- Consiglio AR, Bridges RS (2009) Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behavioural Brain Research* 197:97-102
- Cooper MA, Grober MS, Nicholas C, Huhman KL (2009) Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT1A mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 161(3):680-90

- Critchley HD, Simmons A, Daly EM, Russell A, van Amelsvoort T, Robertson DM, et al. (2000) Prefrontal and medial temporal correlates of repetitive violence to self and others. *Biol Psychiatr* 47:928–34
- Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR (1994) The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264:1102–5
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. *Science* 289:591–4
- Davis ES, Marler CA (2004) C-Fos changes following an aggressive encounter in female California mice: a synthesis of behavior, hormone changes and neural activity. *Neuroscience* 127:611–624
- De Almeida RMM, Lucion AB (1997) 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdale nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134:392–400
- De Almeida RMM, Miczek KA (2002) Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement (“frustration”) in mice: inhibition by anpirtoline – a 5-HT1B receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 27:171-181
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1978) Intraespecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 23:206-218
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1980) Postpartum aggression in rats: I. Effects of hypophysectomy. *J Comp Physiol Psychol* 94:484–94
- Factor EM, Mayer AD, Rosenblatt JS (1993) Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behav Neurosci* 107:166–85
- Fenelon VS, Poulain DA, Theodosis DT (1993) Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 53:77–89
- Ferreira A, Dahlof LG, Hansen S (1987) Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 101:709–17 see also p. 746
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, Fernández-Guasti A (2002) Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav* 77:197–204

- Fish, EW, Faccidomo S, Miczek KA (1999) Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 146:391-399
- Gammie SC, Nelson RJ (2001) cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Res* 898:232-241
- Gammie SC (2005) Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. *Behav Cogn Neurosci Rev* 4:119-135
- Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB (1998) Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav* 63:351-9
- Giovenardi M, Consiglio AR, Barros HTM, Lucion AB (2000) Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Braz J Medic Biol Res* 33:1-6
- Golden CJ, Jackson ML, Peterson-Rohne A, Gontkovsky ST (1996) Neuropsychological correlates of violence and aggression: a review of the clinical literature. *Aggress Violent Behav* 1:3-25
- Greene JD, Nystrom LE, Engell AD, Darley JM, Cohen JD (2004) The neural bases of cognitive conflict and control in moral judgment. *Neuron* 44:389-400
- Haas D (2009) Participação da amígdala medial póstero-dorsal no comportamento agressivo de ratos: expressão da proteína Fos e efeito da microinjeção de somatostatina. Dissertação de mestrado. Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho. Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.
- Halász J, Tóth M, Kalló I, Liposits Z, Haller J (2006) The activation of prefrontal cortical neurons in aggression—A double labeling study. *Behavioural Brain Research* 175:166-175
- Haller J, Tóth M, Halász J (2005) The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: A double labeling study in rats. *Behavioural Brain Research* 161:88-94
- Haller J, Tóth M, Halász J, De Boer SF (2006) Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiol Behav* 88:173-82
- Hansen S, Ferreira A. Effects of bicuculline infusions in the ventromedial hypothalamus and amygdaloid complex on food intake and affective behavior in mother rats (1986) *Behav Neurosci* 100:410-5

- Hasen NS, Gammie SC (2006) Maternal aggression: New insights from Egr-1. *Brain Research* 1108:147-156
- Hawkins KA, Trobst KK (2000) Frontal lobe dysfunction and aggression: conceptual issues and research findings. *Aggress Violent Behav* 5:147-57
- Insel TR (1986) Postpartum increases in brain oxytocin binding. *Neuroendocrinology* 44:515-8
- Kheramin S, Body S, Herrera FM, Bradshaw CM, Szabadi E, Deakin JF, Anderson IM (2005) The effect of orbital prefrontal cortex lesions on performance on a progressive ratio schedule: implications for models of inter-temporal choice. *Behav Brain Res* 156:145-152
- Kinsley CH, Bridges RS (1990) Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult odors in female rats. *Dev Psychobiol* 23:331-347
- Knyshevski I, Connor DF, Harrison RJ, Ricci LA, Melloni Jr RH (2005) Persistent activation of select forebrain regions in aggressive, adolescent cocaine-treated hamsters. *Behavioural Brain Research* 159:277-286
- Kollack-Walker S, Watson SJ, Akil H (1997) Social Stress in Hamsters: Defeat Activates Specific Neurocircuits within the Brain. *The Journal of Neuroscience*, 17(22):8842-8855
- Lonstein JS, Gammie SC (2002) Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 26:869-88
- Luo Q, Nakic M, Wheatley T, Richell R, Martin A, Blair RJ (2006) The neural basis of implicit moral attitude—an IAT study using event-related fMRI. *Neuroimage* 30:1449-57
- Madruga CS, Xavier LL, Achaval M, Sanvitto GL, Lucion AB (2006) Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav Brain Res* 166:241-246
- Matsuda S, Peng H, Yoshimura H, Wen TC, Fukuda T, Sakanaka M (1996) Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neurosci Res* 26:157-70
- Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T (1994) Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett* 175:63-6
- Morgan JJ, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 237:192-7

- Morgan JJ, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421–51
- Mos J, Olivier B (1986) RO 15-1788 does not influence postpartum aggression in lactating female rats. *Psychopharmacology* 90:278–80
- Nelson RJ, Trainor BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8(7):536–46
- Nichelli P, Grafman J, Pietrini P, Clark K, Lee KY, Miletich R (1995) Where the brain appreciates the moral of a story. *Neuroreport* 6:2309–13
- Oliver B, Yuong LJ (2002) Animal models of aggression. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. New York: American College of Neuropsychopharmac p.1699–708
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press
- Potegal M (1991) Attack priming and satiation in female golden hamsters: tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggress Behav* 17:327–335
- Price BH, Daffner KR, Stowe RM, Mesulam MM (1990) The compartmental learning disabilities of early frontal lobe damage. *Brain* 113:1383–93
- Robertson HA, Peterson MR, Murphy K, Robertson GS (1989) D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotation behavior. *Brain Res* 503:346–349
- Rosenblatt JS (1975) Selective retrieving by maternal and nonmaternal female rats. *J Comp Physiol Psychol* 88:678–686
- Russel JA, Leng G (1998) Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol* 157:343–359
- Séguin JR (2004) Neurocognitive elements of antisocial behavior: relevance of an orbitofrontal cortex account. *Brain Cogn* 55:185–197
- Stern JM, Kolunie JM (1993) Maternal aggression of rats is impaired by cutaneous anesthesia of the ventral trunk, but not by nipple removal. *Physiol Behav* 54:861–868
- Svare B (1990) Maternal aggression: hormonal, genetic, and developmental determinants. In: *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological and Behavioral Determinants*. NA KRASNEGOR, RS BRIDGES (eds), Oxford UP, New York, pp 118–132

- Trainor BC, Finy MS, Nelson RJ (2008) Paternal aggression in a biparental mouse: Parallels with maternal aggression. *Hormones and Behavior* 53: 200–207
- Veiga CP, Miczek KA, Lucion AB, De Almeida RMM (2007) Effect of 5-HT1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res* 40:825–830
- Veiga CP, Miczek KA, Lucion AB, De Almeida RMM (2010) Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the dorsal raphé nucleus and prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, *in press*.
- Veit R, Flor H, Erb M, Hermann C, Lotze M, GroddW, Birbaumer N (2002) Brain circuits involved in emotional learning in antisocial behavior and social phobia in humans. *Neurosci Lett* 328:233–6
- Volkow ND, Tancredi LR, Grant C, Gillespie H, Valentine A, Mullani N, Wang GJ, Hollister L (1995) Brain glucose metabolism in violent psychiatric patients: a preliminary study. *Psychiatr Res* 61:243–53
- Winkelmann-Duarte EC, Todeschin AS, Fernandes MC, Bittencourt LC, Pereira GAM, Samios VN, Schuh AFS, Achaval ME, Xavier LL, Sanvitto GL, Mandarim-de-Lacerda CA, Lucion AB (2007) Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rat. *Brain Res* 1170:20–30

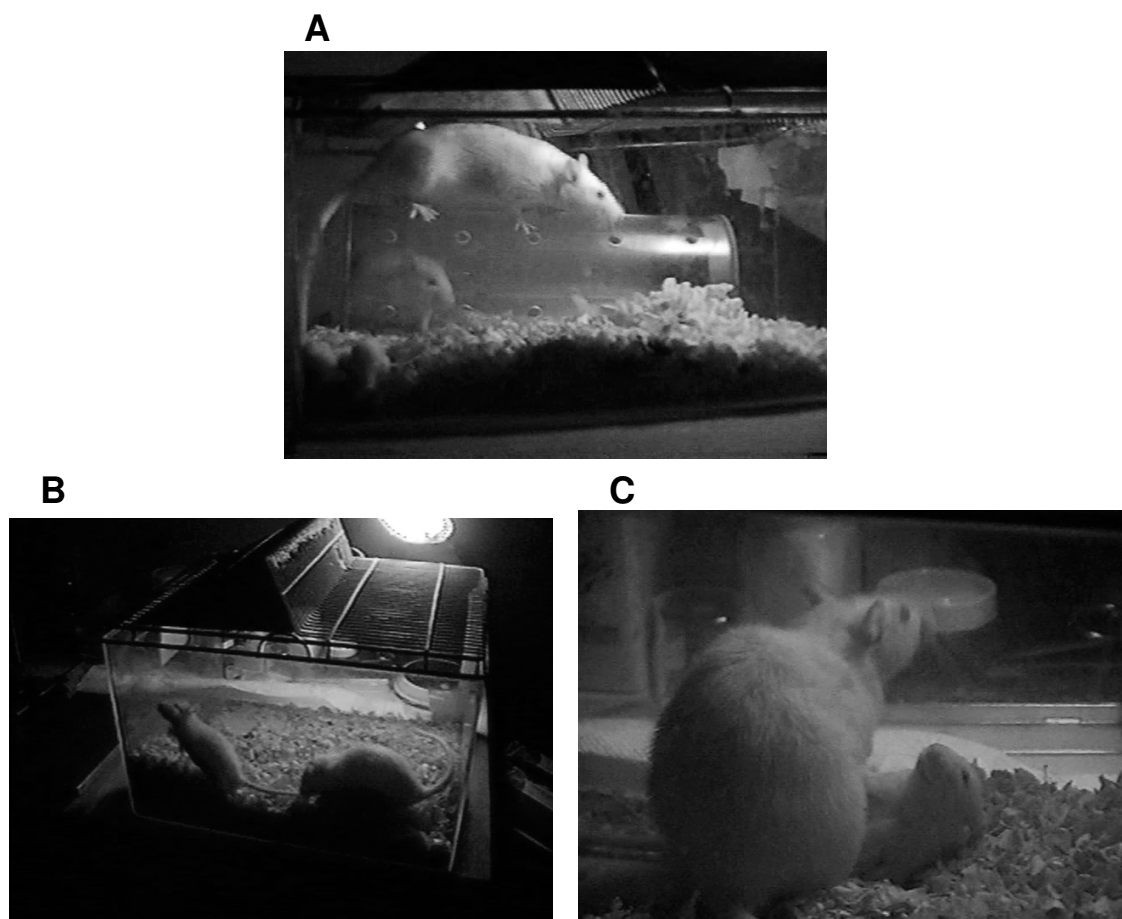


Figura 1 – Fêmea lactante residente investigando o provocador que está protegido no tubo de acrílico durante a provocação social, na caixa da residente, no quinto dia pós-parto, na presença dos filhotes (a frente do tubo) (A). Comportamento de investigar o intruso durante o teste de agressividade na caixa da fêmea residente por 10 minutos (B). Comportamento de dominar o intruso (C).

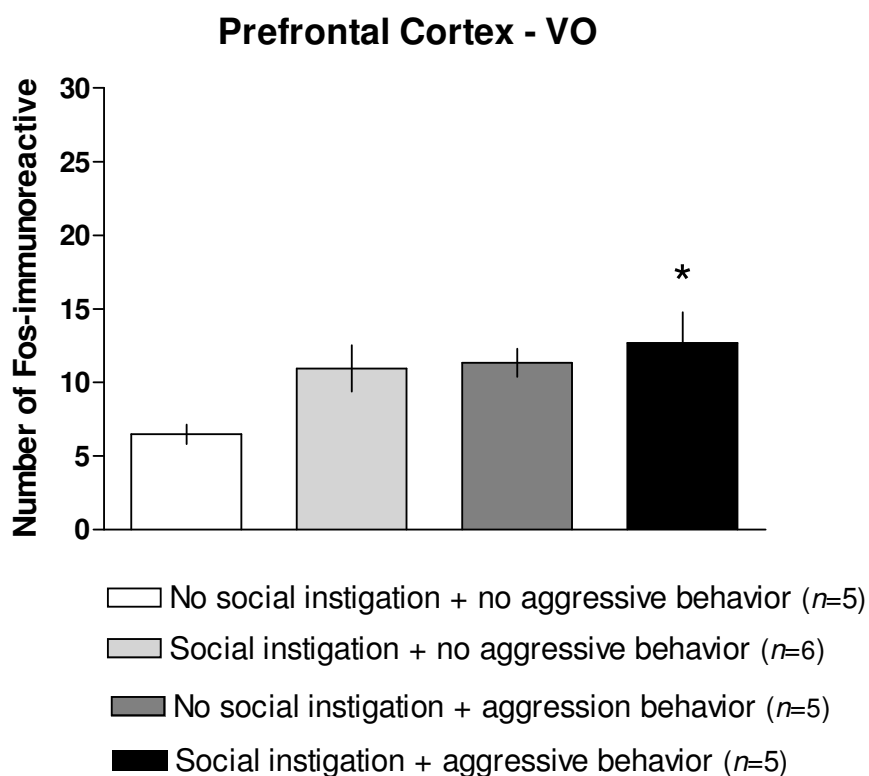


Figura 2 – Média (\pm EPM) do número de células imunorreativas à proteína Fos na região ventro-orbital (VO) do córtex pré-frontal, de ratas residentes lactantes submetidas a provocação social e comportamento agressivo, no quinto dia pós-parto, na presença dos filhotes. *: $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (não provocadas e sem comportamento agressivo).

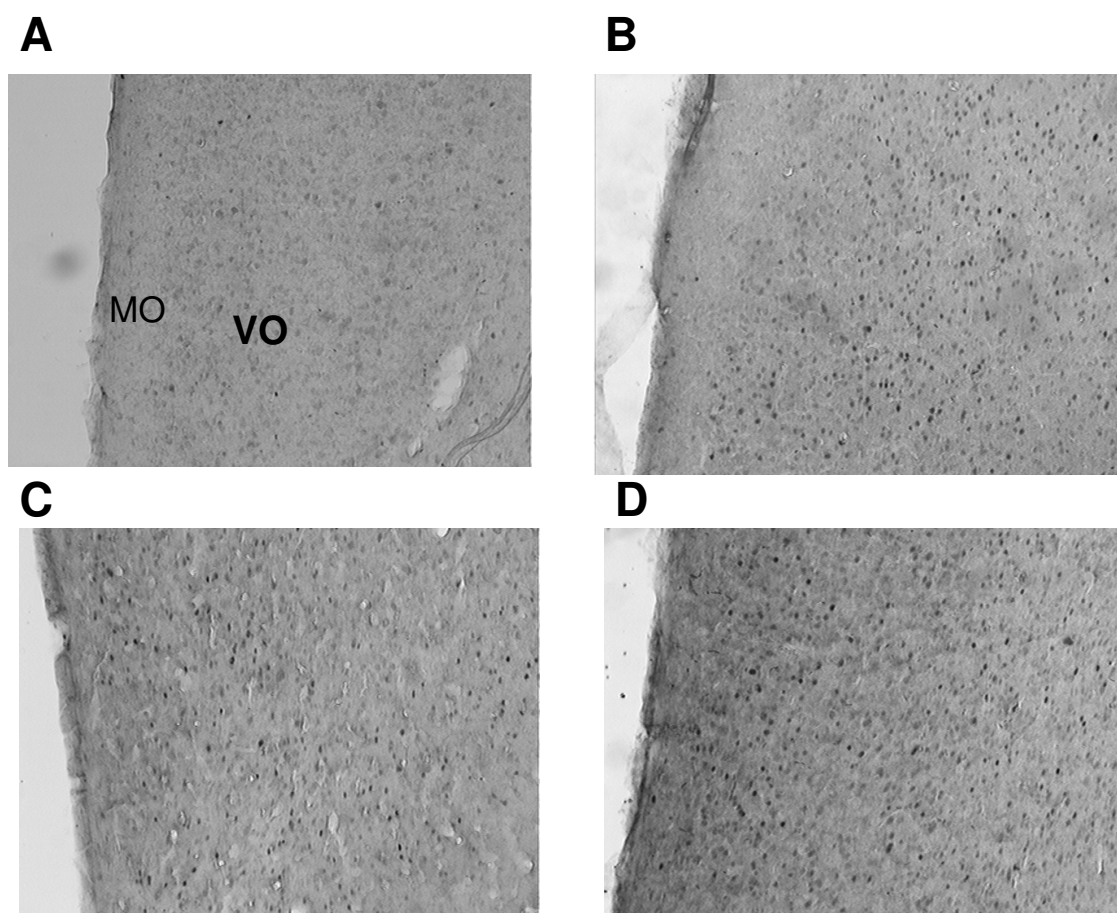


Figura 3 – Cortes coronais do encéfalo de ratas mostrando a região VO PFC onde células imunorreativas à proteína Fos foram quantificadas nos grupos experimentais controle (A)(não provocadas e sem comportamento agressivo), provocadas e sem comportamento agressivo (B), não provocadas e com comportamento agressivo (C) e provocadas e com comportamento agressivo (D). Aumento significativo no número de células positivas para Fos no VO PFC concomitante com expressão de comportamento agressivo maternal podem ser visualizadas em D.

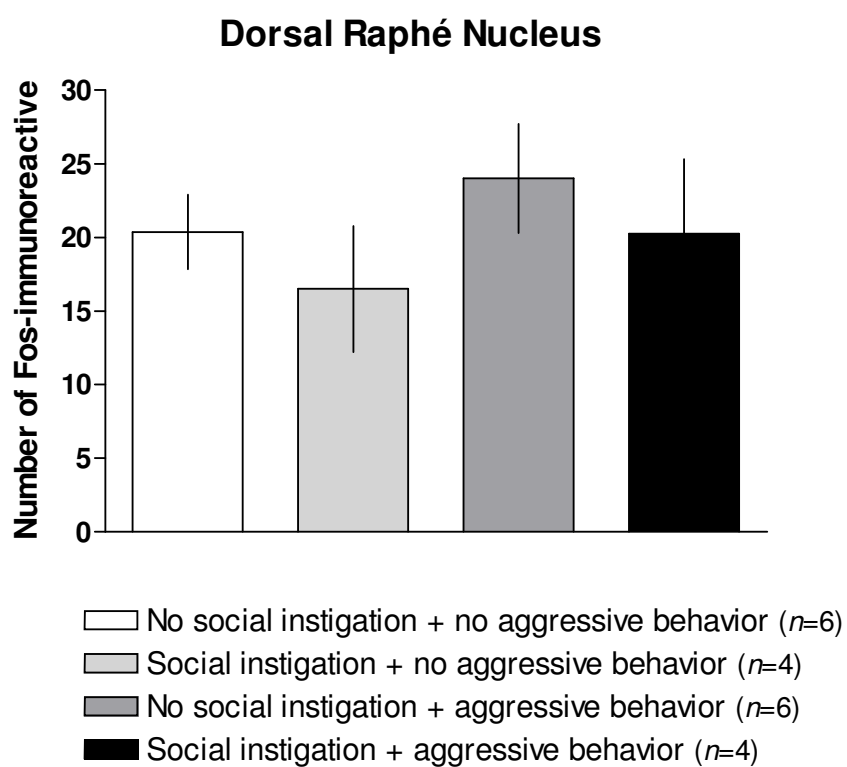


Figura 4 – Média (\pm EPM) do número de células imunorreativas à proteína Fos no núcleo dorsal da rafe (DRN), porções proximal e distal ao aqueduto, de ratas residentes lactantes submetidas a provocação social e comportamento agressivo, no quinto dia pós-parto, na presença dos filhotes.

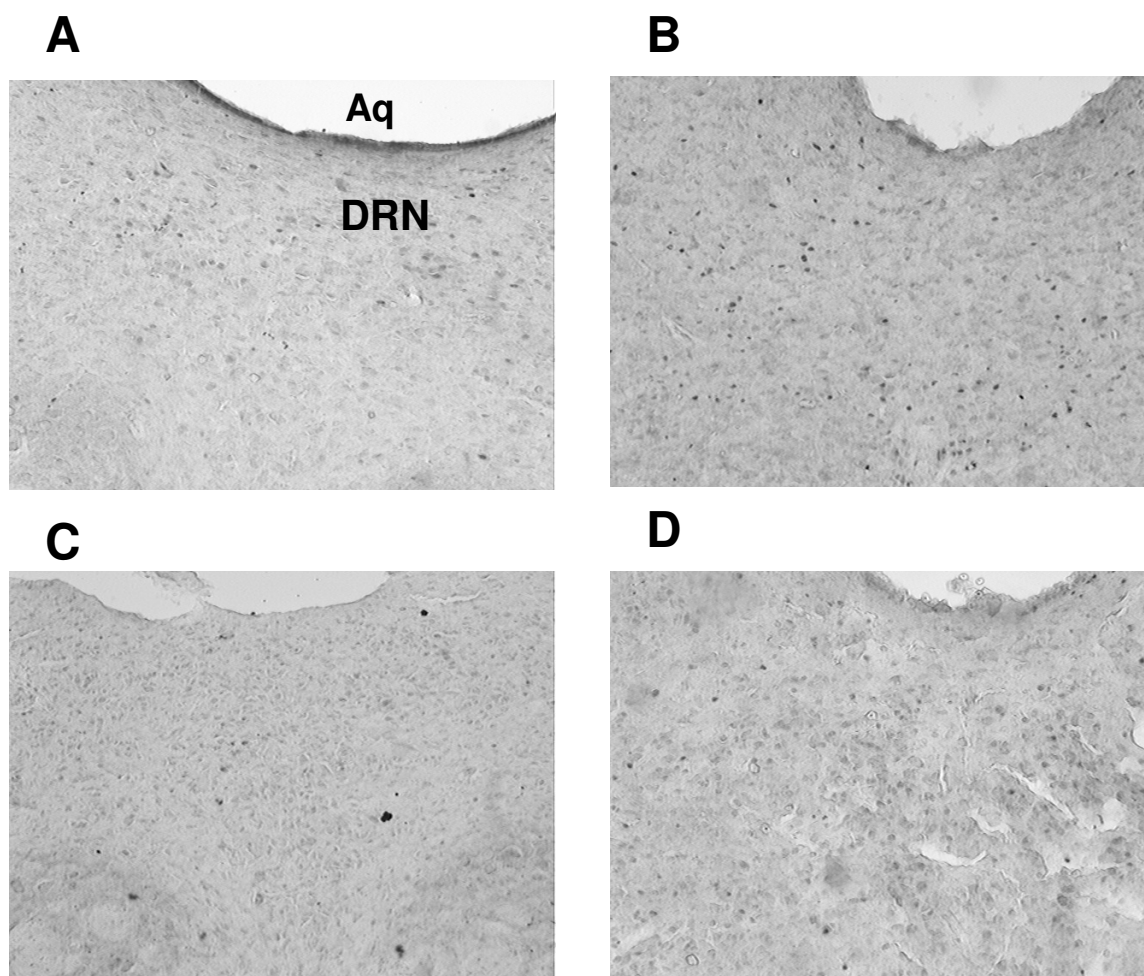


Figura 5 – Cortes coronais do encéfalo de ratas mostrando o DRN (parte proximal, em relação ao Aqueduto - Aq) onde células imunorreativas à proteína Fos foram quantificadas nos grupos experimentais controle (**A**) (não provocadas e sem comportamento agressivo), provocadas e sem comportamento agressivo (**B**), não provocadas e com comportamento agressivo (**C**) e provocadas e com comportamento agressivo (**D**).

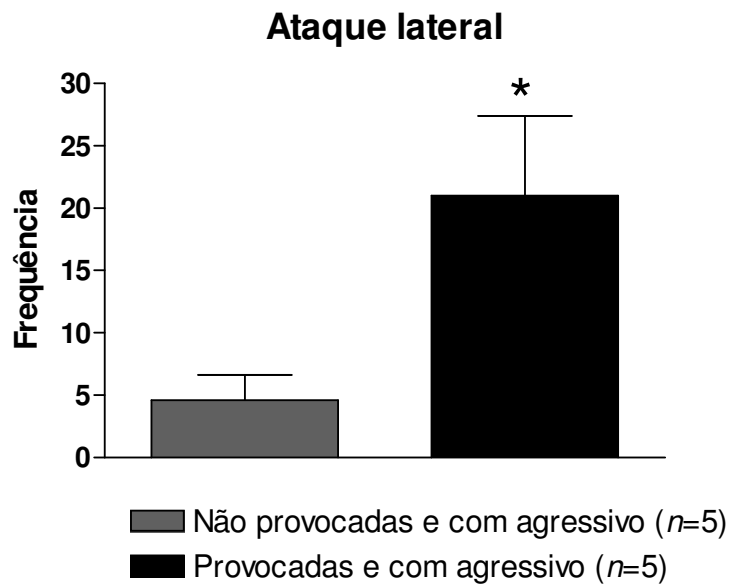


Figura 6 – Efeito da provocação social sobre o comportamento agressivo de ataques laterais de ratas lactantes, no quinto dia pós-parto.

DISCUSSÃO

Esta tese teve como objetivo principal estudar o comportamento agressivo maternal de ratas lactantes, submetidas à provocação social. Inicialmente, foi analisado o efeito da microinjeção de agonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1A} no córtex pré-frontal e no núcleo dorsal da rafe, sobre o comportamento agressivo. Posteriormente, foi avaliado o efeito da provocação social sobre a atividade do eixo HPA, através de dosagens plasmáticas dos hormônios corticosterona, ocitocina, prolactina e progesterona. Por fim, com o intuito de comprovarmos que as regiões encefálicas inicialmente mencionadas (VO PFC e DRN) estavam modulando o comportamento agressivo, a técnica de imunistoquímica para c-Fos foi realizada.

Uma série de protocolos experimentais já foi desenvolvida para aumentar os índices de agressividade em roedores (veja De Almeida *et al.*, 2005 a, para revisão). A provocação ou instigação social é um protocolo experimental utilizado para aumentar o comportamento agressivo típico da espécie. Devido ao fato de que a provocação social aumenta especificamente o comportamento agressivo sem alterar outros padrões comportamentais, como a locomoção, o padrão alimentar ou comportamento sexual (Lagerspetz e Huatojarvi, 1967; Potegal e Tenbrink, 1984; Potegal, 1991), este protocolo torna-se uma ferramenta experimental adequada para o estudo do comportamento agressivo.

No capítulo 1, os experimentos mostraram que a ativação dos receptores 5-HT_{1B} com a microinjeção de CP-93,129, no VO PFC, diminuiu significativamente o comportamento agressivo das fêmeas no período pós-parto. O agonista dos receptores 5-HT_{1B} CP-93,129 reduziu o comportamento agressivo maternal na maior dose (1,0 µg) e até mesmo na menor (0,1 µg) houve uma tendência em reduzir o comportamento agressivo maternal. Os comportamentos não-agressivos como locomoção e investigação social não foram alterados, demonstrando a especificidade comportamental dos receptores 5-HT_{1B} na

modulação do comportamento agressivo maternal. Suporte adicional para a especificidade dos receptores 5-HT_{1B} na modulação do comportamento agressivo maternal foi dado através dos resultados obtidos nesta tese com a microinjeção do antagonista dos receptores 5-HT_{1B} SB-224,289, que reverteu os efeitos anti-agressivos do CP-93,129. CP-93,129 e SB-224,289 são compostos com alta afinidade pelos receptores 5-HT_{1B} ($pK_i = 8.1$ e $pK_i = 8.2$, respectivamente), quando comparados com outros subtipos de receptores da família 5-HT₁ (Roberts *et al.*, 2001; Centenaro *et al.*, 2008). Trabalhos têm mostrado que a administração sistêmica ou local (De Boer e Koolhaas, 2005; Bannai *et al.*, 2007; Veiga *et al.*, 2007; Centenaro *et al.*, 2008) de CP-93,129 tem apresentado potentes efeitos anti-agressivos, sem modificar outros tipos de comportamentos não-agressivos.

Por outro lado, a estimulação dos autorreceptores 5-HT_{1A} no DRN através da microinjeção do agonista 8-OH-DPAT aumentou significativamente o comportamento agressivo das fêmeas no período pós-parto. Este é o primeiro estudo que demonstrou aumento do comportamento agressivo em fêmeas no período pós-parto com a microinjeção de 8-OH-DPAT no DRN após provocação social. O 8-OH-DPAT aumentou elementos importantes do comportamento agressivo possivelmente, devido a um mecanismo de controle nos neurônios serotoninérgicos do DRN; causando uma auto-inibição via ação sob os autorreceptores 5-HT_{1A} (Sprouse e Aghajanian, 1987). A ativação dos receptores 5-HT_{1A} deve ter conduzido a uma abertura dos canais de potássio causando uma hiperpolarização (Sprouse e Aghajanian, 1987) e inibição do impulso nas células serotoninérgicas (Sprouse e Aghajanian, 1986, 1987; VanderMaelen *et al.*, 1986; Sinton e Fallon, 1988) e a liberação de serotonina em áreas terminais (Sharp *et al.*, 1989; Adell *et al.*, 1993; Bosker *et al.*, 1994; Kreiss e Lucki, 1994; Casanovas *et al.*, 1997), incluindo o córtex pré-frontal. Assim, com a técnica da microinjeção, utilizada nos experimentos é provável que o 8-OH-DPAT tenha

induzido uma diminuição no fluxo de serotonina ao córtex pré-frontal, com uma diminuição do comportamento agressivo pela atuação em receptores pré-sinápticos primariamente.

Os dados da literatura tentam estabelecer os papéis dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} na modulação do comportamento agressivo, mas estes estudos continuam gerando resultados conflitantes e muitos debates (Sijbesma *et al.*, 1991; Mos *et al.*, 1993; Sanchez e Hyttel, 1994; De Almeida e Lucion, 1997; Millan *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos, que vão ao encontro com os resultados obtidos nesta tese, apontam para os efeitos anti-agressivos dos receptores 5-HT_{1A} via ativação dos receptores serotoninérgicos pós-sinápticos (Sijbesma *et al.*, 1991; Mos *et al.*, 1992, 1993; Olivier e van Oorschot, 2005). Microinjeções de CP-93,129 ou CP-94,253 no DRN exercem efeitos anti-agressivos, que resultam da ação em múltiplos lugares, como nos autorreceptores somatodendríticos, autorreceptores terminais pré-sinápticos e heterorreceptores pós-sinápticos (Bannai *et al.*, 2007; Faccidomo *et al.*, *submitted*). Estudos com agonistas completos ou parciais dos receptores 5-HT_{1B} como CP-94,253, eltoprazine, TFMPP, zolmitriptan e anpirtolina têm apresentado efeitos anti-agressivos, independente dos níveis basais de comportamento agressivo (Olivier e Mos, 1986; Mos *et al.*, 1992; De Almeida e Miczek, 2002; Miczek *et al.*, 2002), que podem ser mediados pelos autorreceptores somatodendríticos (Bannai *et al.*, 2007, Faccidomo *et al.*, *submitted*) ou heterorreceptores pós-sinápticos (De Almeida *et al.*, 2001).

Em contrapartida, outros estudos indicam um possível papel dos autorreceptores 5-HT_{1A} nos efeitos anti-agressivos, como o BMY-7378 (White *et al.*, 1991), NAN-190 (Sanchez *et al.*, 1996) e, particularmente, o S-15535 (Millan *et al.*, 1997; De Boer e Koolhaas, 2005). Trabalhos têm mostrado que o comportamento agressivo maternal em

ratas foi diminuído após administração sistêmica de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} como ipsapirone, 8-OH-DPAT e buspirona, e pelo agonista dos receptores 5-HT_{2A/C} DOI (Olivier *et al.*, 1985, 1986, 1995; Ferreira *et al.*, 2000; Lonstein e Gammie, 2002), fluprazine e fluvoxamine (Olivier *et al.*, 1995; Lonstein e Gammie, 2002).

Assim, o capítulo 1 mostrou que o CP-93,129, quando microinjetado na região VO PFC das fêmeas provocadas socialmente, no período pós-parto, atuando ou nos autorreceptores pré-sinápticos ou nos heterorreceptores pós-sinápticos 5-HT_{1B}, reduzem o comportamento agressivo maternal. Em contrapartida, a ativação dos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} através da microinjeção de 8-OH-DPAT no DRN, aumentou o comportamento agressivo maternal das fêmeas lactantes.

No capítulo 2, os experimentos demonstraram, de maneira surpreendente, que ratas lactantes, submetidas à provocação social ou ao confronto agressivo, na presença dos seus filhotes, apresentam uma redução nos níveis plasmáticos de corticosterona, ocitocina, prolactina e progesterona.

Neumann *et al.* (2001) mostraram que, após o teste defensivo maternal houve um aumento, porém não significativo, nos níveis de corticosterona, nas ratas lactantes, mas a metodologia empregada por estes pesquisadores diferiu do nosso trabalho, pois foi utilizada uma lactante como intrusa. Quando uma intrusa virgem foi testada, a resposta de secreção de corticosterona foi menor. Assim, nossos resultados poderiam ser explicados, em parte, devido à metodologia, como por exemplo, a utilização de um intruso macho.

Deschamps *et al.* (2003) encontraram um aumento significativo nos níveis de corticosterona, após o teste residente/intruso, quando as fêmeas lactantes foram testadas com os filhotes na caixa residente. Nos nossos experimentos os filhotes também estavam presentes durante o teste de agressão maternal, mas pode ser inferido que as diferenças nas

linhagens dos animais possam interferir com a resposta de secreção de corticosterona, pois foram utilizadas ratas Wistar nos nossos experimentos, e Deschamps *et al.* (2003) usaram ratas Sprague-Dawley.

Foi constatado, que as variações nos níveis plasmáticos de corticosterona, demonstrados nesta tese, não dependem da frequência e duração de agressividade apresentada pelas lactantes. O fator mais relevante foi a presença do intruso. Podemos inferir que a lactação esteja interferindo com esta redução do eixo HPA, pois em ratas virgens (não-lactantes), a secreção de corticosterona aumenta após o teste do residente/intruso (Deschamps *et al.*, 2003). De acordo com os trabalhos de Fischer e colaboradores (1995), bem como os trabalhos de Lightman e colaboradores (2001), nossos resultados vão ao encontro com os dados da literatura, pois os níveis basais de corticosterona foram elevados nas ratas lactantes do grupo controle. A resposta ao estresse, em lactantes, onde ocorre uma diminuição dos níveis plasmáticos de corticosterona, poderia estar ocorrendo devido a uma diminuição na resposta de ACTH frente a situações de estresse, como resultado da produção diminuída de CRH e sua consequente liberação diminuída pelos neurônios pPVN (Brunton *et al.*, 2008). Em relação aos níveis basais, em ratas lactantes, onde a concentração plasmática de corticosterona está aumentada, outro fator que contribui para a atividade basal aumentada do eixo HPA é a presença contínua dos filhotes. Isto foi demonstrado em experimentos nos quais os níveis de ACTH e corticosterona começaram a diminuir quando os filhotes foram afastados por um período de 3,5 h das mães (Walker *et al.*, 1992; Fischer *et al.*, 1995). Assim, torna-se evidente que a atividade basal aumentada do eixo HPA é dado pela sucção (Brunton *et al.*, 2008).

A provocação social não aumentou o comportamento agressivo das ratas lactantes, possivelmente devido ao fato de haver uma grande variabilidade nos níveis de

agressividade das fêmeas lactantes pertencentes ao mesmo grupo experimental. Efeitos similares também foram encontrados por Padovan e Guimarães (2004) e possivelmente um número maior de animais seja necessário para o estudo da agressividade em ratas lactantes.

As dosagens plasmáticas realizadas nos machos foram executadas com o objetivo de comprovar que o estresse causado pela provocação social e ou comportamento agressivo é capaz de alterar a secreção de corticosterona, causando uma resposta contrária àquela observada nas lactantes. Nossos resultados demonstraram que realmente, nos machos adultos, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais submetidos somente à provocação social e também no grupo que teve comportamento agressivo quando comparados com o grupo controle. Assim, os dados deste estudo corroboram com os resultados da literatura, onde um único episódio de estresse social, utilizando o paradigma residente/intruso, aumentou os níveis de corticosterona nos machos (Hucklebridge e Nowell, 1974; Zayan, 1991; Haller *et al.*, 1995; Wotjak *et al.*, 1996; Koolhaas *et al.*, 1997; Miczek *et al.*, 1999).

De maneira geral, esta redução da resposta do eixo HPA de ratas lactantes a estímulos do ambiente, demonstrada nesta série de experimentos, poderia ser devido a alguns fatores. Primeiro, poderia ser resultado de uma secreção diminuída de CRH (pelos neurônios do pPVN) e/ ou vasopressina, pois trabalhos mostram que há uma diminuição nos níveis de RNAm para CRH, em resposta ao estresse (Lightman e Young, 1989; Lightman e Harbuz, 1993; Da Costa *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2001) e de c-fos (Da Costa *et al.*, 1996; Woodside e Amir, 1997; Shanks *et al.*, 1999; Deschamps *et al.*, 2003) em neurônios no PVN. Segundo, poderia estar ocorrendo uma redução na sensibilidade da hipófise anterior ao CRH/ e ou AVP, pois trabalhos com ovelhas lactantes mostram que a concentração plasmática de ACTH não foi aumentada durante estresse por contenção

(Tilbrook *et al.*, 2006). Terceiro, é possível que esteja ocorrendo uma redução na atividade das vias aferentes ao PVN (Stern e Voogt, 1973; Lightman e Young, 1989; Da Costa *et al.*, 1996, 1997; Shanks *et al.*, 1999), pois regiões encefálicas responsáveis pelo processamento de informações referentes a estressores, são menos ativadas (Herman *et al.*, 2005). Outro mecanismo que poderia estar contribuindo para a redução da resposta do eixo HPA de ratas lactantes a estímulos do ambiente, seria uma redução nas aferências estimulatórias noradrenérgicas ao PVN que alteram a atividade do eixo HPA (Lightman *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004; Douglas, 2005; Tu *et al.*, 2005). Em condições normais, as aferências noradrenérgicas do tronco encefálico (Sawchenko e Swanson, 1982; Plotsky *et al.*, 1989; Stanford, 1995; Herman e Cullinan, 1997; Sawchenko *et al.*, 2000; Herman *et al.*, 2003; Flugge *et al.*, 2004; Douglas, 2005) estimulam o eixo HPA durante situações de estresse, aumentando a síntese e a secreção de CRH e AVP (ver Douglas, 2005, para revisão).

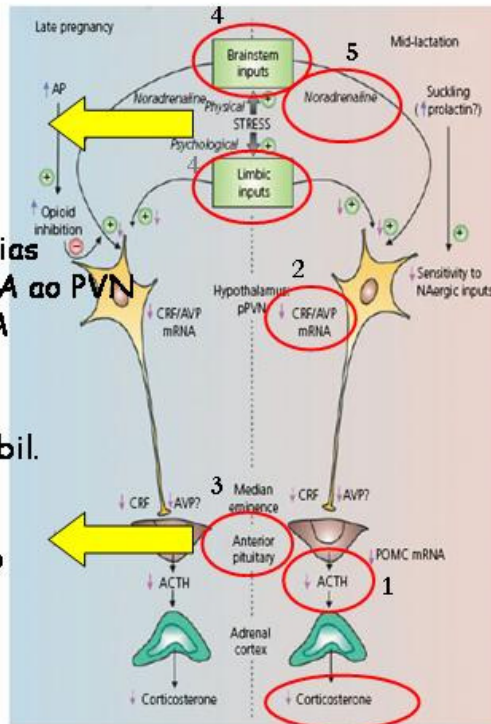
Outro fator que deve ser levado em consideração é o estímulo da sucção, pela amamentação, causado pelos filhotes, ou, pelo menos em parte, pela presença dos filhotes. Este, apresenta um papel essencial na manutenção da redução da resposta do eixo HPA de ratas lactantes (Walker *et al.*, 1992), embora os mecanismos precisos não estejam ainda bem estabelecidos (Tilbrook *et al.*, 2006). O efeito da presença dos filhotes depende da relevância do estressor: no início da lactação, um estressor que ameace os filhotes (macho intruso ou odor do predador), estimula a resposta maternal do eixo HPA, somente se os filhotes estão presentes, durante o estresse (Deschamps *et al.*, 2003). A resposta ao estressor parecer estar relacionada com o comportamento de medo ou para proporcionar segurança das mães para com sua ninhada, e a perda desta resposta no final da lactação pode estar relacionada com a expressão reduzida de RNAm para CRH na amígdala (Deschamps *et al.*, 2003). (Figura 1)

Resposta ao estresse em lactantes

4) Redução atividade vias aferentes ao PVN

5) Redução aferências estimulatórias NA ao PVN alteram eixo HPA

3) Redução sensibil. da hipófise ao CRH e ou AVP (ovelhas [] ACTH não aumenta estresse contensão)



1) Diminuição na resposta do ACTH, frente situações estresse

2) Produção diminuída CRH - liberação (dimin. RNAm para CRH, ao estresse e c-fos, no PVN)

Níveis basais: [] aument. Corticos.

Presença contínua dos filhotes

Figura 1 – Esquema representativo resumindo as respostas ao estresse em lactantes.

(Adaptado de Brunton et al., 2008).

Os resultados obtidos no capítulo 2 desta tese, na qual foi observada uma redução da resposta do eixo HPA de ratas lactantes frente um estímulo estressor, podem ser interpretados como uma resposta de vital importância para o bem-estar da mãe (Slattery e Neumann, 2008); para que ela possa exercer uma resposta ideal de cuidado para com a sua prole. Trabalhos têm demonstrado que a secreção reduzida dos hormônios frente ao estresse, durante a lactação, é importante para prevenir níveis circulantes excessivos de glicocorticóides, que podem afetar o desenvolvimento normal dos filhotes (Altemus *et al.*, 1995; McCormick *et al.*, 1995; Vallee *et al.*, 1997; Weinstock, 2001). Nos seres humanos, por exemplo, o período pós-parto é aquele no qual aumenta a vulnerabilidade da mãe a desenvolver transtornos de humor (O'Hara e Swain, 1996; Llewellyn *et al.*, 1997; Pedersen, 1999; Mastorakos e Ilias, 2000) que podem durar até um ano e afetar significativamente o desenvolvimento do recém-nascido e a unidade familiar.

Em resumo, o capítulo 2 mostrou que a provocação social e o comportamento agressivo causam uma significativa redução nos níveis hormonais nas ratas lactantes, na presença dos seus filhotes. Mas, por outro lado, nos machos adultos, houve um aumento na secreção de corticosterona. Assim, estes resultados confirmam que a lactação é um fator relevante na determinação das respostas neuroendócrinas ao estresse.

O capítulo 3 teve como objetivo principal avaliar a ativação da região VO PFC e DRN através da expressão de c-Fos, nos mesmos quatro grupos experimentais mencionados no capítulo 2. De maneira inicialmente esperada, os experimentos demonstraram que ratas lactantes, no quinto dia pós-parto, submetidas à provocação social e comportamento agressivo, contra um macho intruso, na presença dos filhotes, aumentam a expressão da imunorreatividade à proteína Fos (Fos-Ir) especificamente na região VO do PFC. Este é o primeiro trabalho que avalia a ativação neuronal no córtex pré-frontal, especificamente na

região ventro-orbital de ratas lactantes, pois ainda não há trabalhos demonstrando as regiões encefálicas que expressam aumento na Fos-Ir em lactantes submetidas a protocolos experimentais de agressividade escalada, como a provocação social. Alguns estudos têm mostrado que, após agressão maternal, ocorre aumento na expressão de c-Fos na amígdala medial, núcleo da estria terminal, núcleo paraventricular do hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (Stern e Gallo, 1998; Gammie e Nelson, 2001). Camundongos machos parentais (que cuidam dos filhotes), apresentam aumento na expressão de c-Fos na área pré-óptica medial, hipotálamo ventromedial e amígdala medial (Trainor *et al.*, 2008) e estas mesmas regiões também expressam Fos no contexto de agressão maternal (Gammie, 2005).

Experimentos realizados com ratos machos mostraram que em relação as regiões VO e LO do córtex pré-frontal, ocorre um aumento na ativação neuronal após encontro agressivo e esta ativação foi especialmente maior em camundongos machos previamente selecionados com altos índices de agressividade (Haller *et al.*, 2006). Assim, estes trabalhos dão indícios de que nossos resultados vão ao encontro com os dados da literatura, pois nossos resultados também demonstraram aumento da ativação neuronal na região VO.

Por outro lado, não houve alteração na expressão de c-Fos no DRN das lactantes, após exposição à provocação social ou teste de agressividade. Podemos inferir que as células fos-positivas no DRN sejam neurônios serotoninérgicos, pois de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisas, foi demonstrado que a microinjeção do agonista dos receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT no DRN aumentou o comportamento agressivo de lactantes (Veiga *et al.*, 2010) e que possivelmente esteja ocorrendo uma redução de serotonina nesta área.

Alguns trabalhos mostram que a rafe está envolvida com a modulação do comportamento agressivo. Por exemplo, Haller *et al.* (2005), mostraram que contatos psicossociais e confrontos agressivos induzem a um amplo aumento na ativação de c-Fos na rafe, mas em ratos machos Wistar e que parte dos neurônios ativados são serotoninérgicos. Estes encontros psicossociais são semelhantes a provocação social, onde o rato é confrontado com outro macho, sendo que este último está protegido do oponente por uma caixa transparente perfurada, onde é capaz de ver, ouvir e cheirar o outro macho.

Dessa forma, os resultados do capítulo 3 complementam resultados prévios (capítulo 1) com microinjeções de agonista 5-HT_{1B} na região VO PFC e agonista 5-HT_{1A} no DRN, comprovando que estas regiões são importantes na modulação do comportamento agressivo maternal.

CONCLUSÕES

Através dos experimentos desenvolvidos, é possível concluir nesta tese que:

- A provocação social é um protocolo experimental que aumenta o comportamento agressivo de ratas Wistar no período pós-parto, podendo ser utilizada como uma ferramenta para testar o efeito de fármacos que modulam a agressividade;
- Os autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} , quando estimulados pela microinjeção de 8-OH-DPAT no núcleo dorsal da rafe aumentam o comportamento agressivo das fêmeas no período pós-parto devido a uma ativação inibitória dos receptores 5-HT_{1A} ;
- A ativação dos receptores 5-HT_{1B} na região ventro-orbital do córtex pré-frontal, através da microinjeção de CP-93,129 diminui os elementos ofensivos do comportamento agressivo das fêmeas no período pós-parto e a participação seletiva destes receptores foi verificada pela reversão dos efeitos anti-agressivos com a utilização do agonista SB-224,289;
- É possível que os efeitos anti-agressivos do CP-93,129 ocorram devido à estimulação dos receptores pós-sinápticos, mas estudos adicionais com microinjeção deste agonista no DRN e outras regiões encefálicas ainda são necessários para elucidar os mecanismos de ação desses receptores e sua localização precisa;

- A provocação social e o confronto agressivo causam uma redução significativa na secreção dos hormônios relacionados ao estresse, em ratas lactantes, na presença dos seus filhotes e esta resposta está relacionada com o período da lactação, pois nos machos adultos houve uma resposta inversa na secreção de corticosterona;
 - Ratas lactantes provocadas socialmente e submetidas ao comportamento agressivo, no quinto dia pós-parto, na presença dos filhotes, aumentam a imunorreatividade à proteína Fos na região ventro-orbital do córtex pré-frontal e no núcleo dorsal da rafe não ocorre alteração na expressão da proteína Fos, mas uma análise mais detalhada das subregiões do DRN é necessária. Assim, nossos resultados demonstram que especificamente a região VO PFC é importante na modulação da agressividade maternal.
-

PERSPECTIVAS

- Avaliar o papel dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} através da microinjeção de agonistas serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe e na região ventro-orbital do córtex pré-frontal, respectivamente, sobre o comportamento agressivo de ratos machos, para verificar se os efeitos encontrados nas fêmeas são específicos do gênero;
- Investigar se os resultados mostrados nesta tese, em relação ao funcionamento dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no núcleo dorsal da rafe e na região ventro-orbital do córtex pré-frontal, respectivamente, se estendem a outras espécies, como por exemplo, camundongos provocados socialmente;
- Avaliar se a provocação social é capaz de causar mudanças genômicas, por exemplo, alterar a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, tanto em machos quanto em fêmeas;
- Estudar outras regiões encefálicas, como a área infra-límbica do córtex pré-frontal, área septal medial, amígdala medial e PAG, através de microinjeções, para ampliar o estudo do comportamento agressivo maternal;
- Investigar se outros protocolos experimentais de agressividade escalada, como álcool ou frustração não recompensada, também são capazes de aumentar o comportamento agressivo maternal;

- Investigar o efeito da provocação social e do comportamento agressivo em ratas lactantes, sobre os níveis hormonais (corticosterona, ocitocina, progesterona e prolactina) em tempos diferentes de coleta do sangue;
 - Analisar se ocorre alteração na expressão de c-Fos, em ratas lactantes provocadas socialmente e ou submetidas ao comportamento agressivo, em outras regiões específicas do córtex pré-frontal, como pré-límbica, infra-límbica, córtex cingulado anterior e córtex orbital medial e impreterivelmente, analisar especificamente a região lateral do núcleo dorsal da rafe.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELGUNDE, M., SOENGAS, J.L., ROZAS, G. Acute effects of Ltryptophan on tryptophan hydroxylation rate in brain regions (hypothalamus and medulla) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* 286: 131-135, 2000.

ADELL, A., CELADA, P., ABELLAN, M.T., ARTIGAS, F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev* 39: 154-180, 2002.

AGRATI, D., ZULUAGA, M.J., FERNÁNDEZ-GUASTI, A., MEIKLE, A., FERREIRA, A. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Horm Behav* 53: 232-40, 2008.

AGHAJANIAN, G.K., WANG, R.Y. Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122: 229-242, 1977.

ALBERT, D.J., WALSH, M.L. Neural systems and the inhibitory modulation of agonistic behavior: a comparison of mammalian species. *Neurosci Biobehav Rev* 8: 5-24, 1984.

ALBERT, D.J., JONIK, R.H., WALSH, M.L. Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal, and neural foundations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16: 177-192, 1992.

ALBERT, D.J., WALSH, M.L., JONIK, R.H. Aggression in humans: what is its biological foundation? *Neurosci Biobehav Rev* 17:405-25, 1993.

ALTEMUS, M., DEUSTER, P.A., GALLIVEN, E., CARTER, C.S., GOLD, P.W. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in lactating women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 2954-2959, 1995.

ALTEMUS, M., REDWINE, L.S., SEONG, Y.M., FRYE, C.A., PORGES, S.W., CARTER, C.S. Responses to laboratory psychosocial stress in postpartum women. *Psychosom Med* 63: 814-821, 2001.

AMSEL, A., ROUSSEL, J. Motivational properties of frustration. 1. Effect on a running response of the addition of frustration to the motivational complex. *J Exp Psychol* 43: 363-368, 1952.

ANDERSON S.W., BECHARA A., DAMASIO H., TRANEL D., DAMASIO A.R. Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nat. Neurosci.* 2: 1032-1037, 1999.

APTER, A., VAN PRAAG, H.M., PLUTCHIK, R., SEVY, S., KORN, M., BROWN, S.L. Interrelationships among anxiety, aggression, impulsivity, and mood: a serotonergically linked cluster? *Psychiatry Res* 32: 191-199, 1990.

AZMITIA, E.C., SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641–667, 1978.

AZRIN, N.H., HUTCHINSON, R.R., HAKE, D.F. Extinction induced aggression. *J Exp Anal Behav* 9: 191–204, 1966.

BADING, H., GINTY, D.D., GREENBERG, M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260: 181–6, 1993.

BAMSHAD, M., KAROM, M., PALLIER, P., ALBERTS, H.E. Role of the central amygdala in social communication in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Brain Res* 744: 15–22, 1997.

BARABAN, J.M., AGHAJANIAN, G.K. Suppression of serotonergic neuronal firing by alpha-adrenoceptor antagonists: evidence against GABA mediation. *Eur J Pharmacol* 66: 287–294, 1980.

BARBAS, H., OLMOS, J. Projections from the amygdala to basoventral and mediodorsal prefrontal regions in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 300: 549–571, 1990.

BARBAS, H., HENION, T.H., DERMON, C.R. Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 313: 65–94, 1991.

BAROFSKY, A. L., HARNEU, J.W. Impairments in lactation in the rat following destruction of the median raphe nucleus. *Neuroendocrinology* 26: 333–351, 1978.

BAROFSKY, A. L., TAYLOR, J., TIZABI, Y., KUMAR, R., JONES-QUARTEY, K. Specific neurotoxin lesions of median raphe serotonergic neurons disrupt maternal behavior in the lactating rat. *Endocrinology* 113: 1884–1893, 1983.

BARRAT, E.S. Impulsiveness and aggression. In J. Monahan, & H. Steadman (Eds.), *Violence and mental disorder: Developments in risk assessment* (pp. 61–79). Chicago: University of Chicago Press, 1994.

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

BASSARATH, L. Neuroimaging studies of antisocial behavior. *Can J Psychiatr* 46: 728–32, 2001.

BAUMGARTEN, H.G., GROZDANOVIC, Z. Anatomy of central serotonergic projection systems. In: Baumgarten, H.G., Gothert, M. (Eds.), *Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS*. Springer, Berlin, pp. 41–71, 1997.

BELL, R., HOBSON, H. 5-HT_{1A} receptor influences on rodent social and agonistic behavior: A review and empirical study. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 325-338, 1994.

BENNETT, A.J., LESCH, K.P., HEILS, A., LONG, J.C., LORENZ, J.G., SHOAF, S.E., CHAMPOUX, M., SUOMI, S.J., LINNOILA, M.V., HIGLEY, J.D. Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function. *Mol Psychiatry* 7: 118-122, 2002.

BERGER, B., TROTTIER, S., VERNEY, C., GASPARD, P., ALVAREZ, C. Regional and laminar distribution of the dopamine and serotonin innervation in the macaque cerebral cortex: a radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* 273: 99-119, 1988.

BERKOWITZ, L. Aversively stimulated aggression: some parallels and differences in research with animals and humans. *Am Psychol* 38:1135-1144, 1983.

BERMAN, M.E., TRACY, J.I., COCCARO, E.F. The serotonin hypothesis of aggression revisited. *Clin. Psychol. Rev.* 17: 651-665, 1997.

BERRY, M.S. Ethanol-induced enhancement of defensive behavior in different models of murine aggression. *J Stud Alcohol* 11: 156-162, 1993.

BEST, M., WILLIAMS, J.M., COCCARO, E.F. Evidence for a dysfunctional prefrontal circuit in patients with an impulsive aggressive disorder. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8448-53, 2002.

BITO, H., DEISSEROTH, K., TSIEN, R.W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺ and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203-1214, 1996.

BITRAN, D., HILVERS, R.J., KELLOGG, C.K. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav. Neurosci.* 105: 653-662, 1991.

BLAIR, R. J. Neurocognitive models of aggression, the antisocial personality disorders, and psychopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 727-731, 2001.

BLAIR, R.J., PESCHARDT, K.S., BUDHANI, S., MITCHELL, D.G., PINE, D.S. The development of psychopathy. *Child Psychol Psychiatry* 47: 262-76, 2006.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., TAKAHASHI, T. Septal lesions and aggressive behavior. *Behav Biol* 21:157-61, 1977.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Aggressive behavior in the rat. *Behav. Biol.* 21: 197-224, 1977.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. The organization and modeling of animal aggression. In: Brain, P.F., Benton D.(ed). The biology of aggression. Alphen aan den Rijn, The Netherlands: Sijthoff & Noordhoff, 1981 a.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. "The organization and modeling of animal aggression," in The Biology of Aggression, eds P. F. Brain and D. Benton (Alphen aan den Rijn: Sijthoff et Noordhoff), 529–563, 1981 b.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. "The organization and modeling of animal aggression," in The Biology of Aggression, eds P. F. Brain and D. Benton (Alphen aan den Rijn: Sijthoff et Noordhoff), 529–563, 1981.

BLANCHARD, D.C, BLANCHARD, R.J. Inadequacy of pain-aggression hypothesis revealed in naturalistic settings. *Aggress Behav* 10: 33-46, 1984.

BLANCHARD, D.C., FUKUNAGA-STINSON, C., TAKAHASH, L.K., BLANCHARD, R.J., FLANNELLY, K.J. Dominance and aggression in social groups of male and female rats. *Behav Processes* 9: 31-48, 1984.

BLANCHARD, R.J; HORI, K; TOM, P; BLANCHARD, C.D. Social structure and ethanol consumption in the laboratory rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 28: 437-42, 1987.

BLANCHARD, D.C., RODGERS, R.J., HENDRIE, C.A., HORI, K. 'Taming' of wild rats (*Rattus rattus*) by 5HT1A agonists buspirone and gepirone. *Pharmacol Biochem Behav* 31: 269-278, 1988.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neurosc and Biobeh Rev* 14: 455-462, 1991.

BLANCHARD, R.J., WALL, P.M., BLANCHARD, D.C. Problems in the study of rodent aggression. *Horm. Behav.* 44: 161–170, 2003.

BLARI, R.J.R., PESCHARDT, K.S., BUDHANI, S., PINE, D.S. *Biology of Aggression* (ed. Nelson, R. J.). 351–368 (Oxford Univ. Press, New York, 2006).

BLIER, P., CHAPUT, Y., DE MONTIGNY, C. Long-term 5-HT reuptake blockade, but not monoamine oxidase inhibition, decreases the function of terminal 5-HT autoreceptors: an electrophysiological study in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337: 246-254, 1988.

BOESS, F.G., MARTIN, I.L. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 33: 278-317, 1994.

BOSCH, O.J., MEDDLE, S.L., BEIDERBECK, D.I., DOUGLAS, A.J., NEUMANN, I.D. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. *J Neurosci* 25: 6807–15, 2005.

BOULENGUEZ, P., FOREMAN, N., CHAUVEAU, J., SEGU, L., BUHOT, M.C. Distractibility and locomotor activity in rat following intra-collicular injection of a serotonin 1B-1D agonist. *Behav Brain Res* 67: 229-39, 1995.

BOUWKNECHT, J.A., HIJZEN, T.H., VAN DER G.J., MAES, R.A., HEN, R., OLIVIER, B. Absence of 5-HT1B receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT1B knockout mice. *Biol Psychiatry* 49: 557-568, 2001.

BRAIN, P.F. Differentiating types of attack and defensive in rodents. P 53-78. In: BRAIN P.F., BENTON, D (ed.). *Multidisciplinary Approaches to Aggression Research* Amsterdam, Elsevier, 1981.

BROWE, M.C., PRICE, B.H. Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71: 720-726, 2001.

BROWN, G.L., GOODWIN, F.K., BALLENGER, J.C., GOYER, P.F., MAJOR, L.F. Aggression in humans correlates with cerebrospinal fluid amine metabolites. *Psychiatry Res* 1: 131-139, 1979.

BROWN, T.G., WERK, A., CAPLAN, T., SERAGANIAN, P. Violent substance abusers in domestic violence treatment. *Violence Vict* 14: 179-190, 1999.

BRUINVELS, A.T., PALACIOS, J. M., HOYER, D. Autoradiographic characterization and localization of 5-HT1D compared to 5-HT1B binding sites in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 347: 569-582, 1993.

BRUINVELS, A.T., LANDWEHRMEYER, B., GUSTAFSON, E.L. et al. Localization on 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology* 33: 367-386, 1994.

BRUNNER, D., HEN, R. Insights into the neurology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann NY Acad Sci* 836: 81-105, 1997.

BRUNNER, D., BUHOT, M.C., HEN, R., HOFER, M. Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav Neurosci* 113: 587-601, 1999.

BRUNTON, P.J., RUSSEL, J.A., DOUGLAS, A.J. Adaptive Responses of the Maternal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis during Pregnancy and Lactation *Journal of Neuroendocrinology* 20: 764-776, 2008.

BUCHANAN, C.P., SHRIER, E.M., HILL, W.L. Time-dependent effects of pCPA on social aggression in chicks. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 483-8, 1994.

CAPRARA, G.V. A comparison of the frustration aggression and emotional susceptibility hypotheses. *Aggressive Behav* 8: 234-236, 1982.

CARAMASCHI, D., DE BOER, S. F., KOOLHAAS, J.M. Differential role of the 5-HT_{1A} receptor in aggressive and non-aggressive mice: An across-strain comparison *Physiology & Behavior* 90: 590–601, 2007.

CARDINAL, R.M., WINSTANLEY, C.A., ROBBINS, T.W., EVERITT, B.J. Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann. N.Y. Acad Sci* 1021: 33-50, 2004.

CAVADA, C., GOLDAMAN-RAKIC, P.S. Posterior parietal cortex in rhesus monkey: II. Evidence for segregated corticocortical networks linking sensory and limbic areas with the frontal lobe. *J. Comp. Neurol.* 287: 422–445, 1989.

CAVADA, C., COMPANY, T., TEJEDOR, J., CRUZ-RIZZOLO, R.J., REINOSO-SUAREZ, F. The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cereb. Cortex*, 103: 220–242, 2000.

CECCATELLI, S., VILLAR, M.J., GOLDSTEIN, M., HOKFELT, T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9569–73, 1989.

CENTENARO, L.A., ZIMMERMANN, N., MICZEK, K.A. LUCION, A.B., DE ALMEIDA, R.M.M. Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 201: 237-48, 2008.

CHAN, R.K.W., BROWN, E.R., ERICSSON, A., KOVÁCS, K.J., SAWCHENKO, P.E. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFIB, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *Journal of Neuroscience* 13: 5126-5138, 1993.

CHANCE, M.R.A., MACKINTOSH, J.H., DIXON, A.K. The effects of ethyl alcohol on social encounters between mice. *J Alcohol* 8: 90–93, 1973.

CHEREK, D.R., PICKENS, R. Schedule-induced aggression as a function of fixed-ratio value. *J Exp Anal Behav* 14: 309–311, 1970.

CHEREK, D. R., STEINBERG, J.L., VINES, R.V. Low doses of alcohol affect human aggressive responses. *Biol Psychiatry* 19: 263-267, 1984.

CHERMACK, S.T., GIANCOLA, P.R. The relation between alcohol and aggression: an integrated biopsychosocial conceptualization. *Clin Psychol Ver* 17: 621-649, 1997.

CHI, S.I., LEVINE, J.D., BASBAUM, A.I. Effects of injury discharge on the persistent expression of spinal cord fos-like immunoreactivity produced by sciatic nerve transection in the rat. *Brain Res* 617: 220–4, 1993.

CHOPIN, P., MORET, C., BRILEY, M. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine (1B/1D) receptor ligands. *Pharmacol Ther* 62: 385-405, 1994.

CHUNG, K.K., MARTINEZ, M., HERBERT, J. Central serotonin depletion modulates the behavioural, endocrine and physiological responses to repeated social stress and subsequent c-fos expression in the brains of male rats. *Neuroscience* 92: 613–25, 1999.

CHUNG, K.K., MARTINEZ, M., HERBERT, J. c-Fos expression, behavioural, endocrine and autonomic responses to acute social stress in male rats after chronic restraint: modulation by serotonin. *Neuroscience* 95: 453–63, 2000.

CLARK, M.S., SEXTON, T.J., MCCLAIN, M., ROOT, D., KOHEN, R., NEUMAIER, J.F. Overexpression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus using Herpes Simplex Virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. *J. Neurosci.* 22: 4550–4562, 2002.

CLOTFELTER, E.D., O'HARE, E.P., MCNITT, M.M., CARPENTER, R.E., SUMMERS, C.H. Serotonin decreases aggression via 5-HT_{1A} receptors in the fighting fish *Betta splendens* *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 87: 222–231, 2007.

CONDE, F., MAIRE-LEPOIVRE, E., AUDINAT, E., CREPEL, F. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.*, 352: 567–593, 1995.

COCCARO, E.F., ASTILL, J.L., HERBERT, J.L., SCHUT, A.G. Fluoxetine in the treatment of impulsive aggression in DSM-III-R personality disorders patients. *J Clin Psychopharmacol* 10: 373-375, 1990.

COCCARO, E.F., KAVOUSSI, R.J. Fluoxetine and impulsive aggressive behavior in personality-disordered subjects. *Arch Gen Psychiatry* 54: 1081-1088, 1997.

CONNOR, D.F., STEINGARD, R.J. A clinical approach to the pharmacotherapy of aggression in children and adolescents. In Ferris CF, Grisso T (eds), *Understanding Aggressive Behavior in Children*. *Ann NY Acad Sci* 794: 290-307, 1996.

CONSIGLIO, A.R., LUCION, A.B. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 59: 591-596, 1996.

CONSIGLIO, A.R., BORSOI, A., PEREIRA, G., LUCION, A.B. Effects of oxytocin microinjected into different areas of the central nervous system on maternal aggressive behavior. *Physiol Behav* 85: 354–62, 2005.

CONSIGLIO, A.R., BRIDGES, R.S. Circulating prolactin, MPOA prolactin receptor expression and maternal aggression in lactating rats. *Behavioural Brain Research* 197: 97-102, 2009.

COOK, C.J. Oxytocin and prolactin suppress cortisol responses to acute stress in both lactating and non-lactating sheep. *J Dairy Res* 64: 327–339, 1997.

COOPER, M.A., MCINTYRE, K.E., HUHMAN, K.L. Activation of 5-HT_{1A} autoreceptors in the dorsal raphe nucleus reduces the behavioral consequences of social defeat. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1236–1247, 2008.

CORNELIUS, J.R., SOLOFF, P.H., PEREL, J.M., ULRICH, R.F. A preliminary trial of fluoxetine in refractory borderline patients. *J Clin Psychopharmacol* 11: 116-120, 1991.

COSNIER, J., COUTURIER, C. Comportement maternal provoqué chez les rattes adultes castrées. *C R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil.* 160: 789–791, 1966.

CRABBE, J.C., PHILLIPS, T.J., FELLER, D.J., HEN, R., WENGER, C.D., LESSOV, C.N., SCHAFER, G.L. Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. *Nat Genet* 14: 98-101, 1996.

CRABBE, J.C., WAHLSTEN, D., DUDEK, B.C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284: 1670-1672, 1999.

CRITCHLEY, H.D., SIMMONS, A., DALY, E.M., RUSSEL, A., VAN AMELSVOORT, T., ROBERTSON, D.M., et al. Prefrontal and medial temporal correlates of repetitive violence to self and others. *Biol Psychiatr* 47: 928–34, 2000.

CULLINAN, W.E., HERMAN, J.P., BATTAGLIA, D.F., AKIL, H., WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate-early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64: 477-505, 1995.

DACOSTA, A.P.C., WOOD, S., INGRAM, C.D., LIGHTAMN, S.L. Region specific reduction in stress-induced c-fos m-RNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res.* 742: 177-184, 1996.

DALLMA, M.F., PECORARO, N.C., LA FLEUR, S.E., WARN, J.P., GINSBERG, A.B., AKANA, S.F., LAUGERO, K.C., HOUSHYAR, H., STRACK, A.M., BHATNAGAR, S., BELL, M.E. Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res* 153: 75–105, 2006.

DAMASIO, H., GRABOWSKI, T., FRANK, R., GALABURDA, A.M., DAMASIO, A.R. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264: 1102–5, 1994.

DARUNA, J.H., BARNES, P.A. A neurodevelopmental view of impulsivity. In McCown WG, Johnson JL, Shure MB (eds), *The impulsive client: theory, research and treatment.* American Psychological Association, Washington DC, 1993.

DAVIDSON, R.J., PUTNAM, K.M., LARSON, C.L. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. *Science* 289: 591–4, 2000.

DE ALMEIDA, R.M.M., LUCION, A.B. Effects of intracerebroventricular administration of 5-HT receptor agonists on the maternal aggression of rats. *Eur J Neurosci* 264: 445-448, 1994.

DE ALMEIDA, R.M.M., LUCION, A.B. 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomедial amygdala nucleus decreases, but the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* 134: 392-400, 1997.

DE ALMEIDA, R.M.M., NIKULINA, E., FACCIDOMO, S., FISH, E., MICZEK, K.A. Zolmitriptan, a 5-HT_{1B/1D} receptor agonist, alcohol, and aggression in male mice. *Psychopharmacology* 157: 131-141, 2001.

DE ALMEIDA, R.M.M., MICZEK, K.A. Aggression escalated by social instigation or by discontinuation of reinforcement ("frustration") in mice: Inhibition by anpirtoline: a 5-HT_{1B} receptor agonist. *Neuropsychopharmacol* 27: 171-181, 2001.

DE ALMEIDA, R.M.M., ROWLETT, J.K., COOK, J.M., YIN, W., MICZEK, K.A. GABA_A/alpha receptor agonists and antagonist: effects on species-typical and heightened aggressive behavior after alcohol self-administration in mice. *Psychopharmacology* 172: 255-263, 2004.

DE ALMEIDA, R.M.M., GIOVENARDI, M., SILVA, S.P., OLIVEIRA, V.P., STEIN, D.J. Maternal aggression in wistar rats: effect of 5-HT_{2A/2C} receptor agonist and antagonist microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter and medial septum. *Braz J Med Res* 38:597-602, 2005 a.

DE ALMEIDA, R.M.M., FERRARI, P.F., PARMIGIANI, S., MICZEK, K.A. Escalated aggressive behavior: dopamine, serotonin and GABA. *Eur. J. Pharmacol.* 526: 51-64, 2005 b.

DE ALMEIDA, R.M.M., SANTOS, D.M., SAFT, D.M., BENINI, Q., MICZEK, K.A. 5-HT_{1B} receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice. *Psychopharmacology* 185: 441-450, 2006.

DE ALMEIDA, J., PALACIOS, J.M., MENGOD, G. Distribution of 5-HT and DA receptors in primate prefrontal cortex: implications for pathophysiology and treatment. *Progress in Brain Research* Vol. 172 CHAPTER 5 102-115, 2008.

DE ALMEIDA, R.M.M., SAFT, D.M., ROSA, M.M., MICZEK, K.A. Flunitrazepam in combination with alcohol engenders high levels of aggression in mice and rats *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 95: 292-297, 2010.

DE KLOET, E.R., KARST, H., JOELS, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29: 268-272, 2008.

DEL PUNTA, K., LEINDERS-ZUFALL, T., RODRIGUEZ, I., JUKAM, D., WYSOCKI, C.J., OGAWA, S., ZUFALL, F., MOMBAERTS, P. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419: 70–74, 2002.

DESCARRIES, L., WATKINS, K.C., GARCIA, S., BEAUDET, A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* 207: 239–254, 1982.

DELVILLE, Y., DE VRIES, G.J., FERRIS, C.F. Neural connections of the anterior hypothalamus and agonistic behavior in golden hamsters. *Brain Behav Evol* 55: 53-76, 2000.

DE BOER, S.F., KOOLHAAS, J.M. 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol* 523: 125-139, 2005.

DE GROOT, R.P., SASSONE-CORSI, P. Hormonal control of gene expression multiplicity and versatility of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive nuclear regulators. *Molecular Endocrinology* 7: 145:153, 1993.

DIAS, B.G., CREWS, D. Serotonergic modulation of male-like pseudocopulatory behavior in the parthenogenetic whiptail lizard, *Cnemidophorus uniparens*. *Horm Behav* 50: 401–9, 2006.

DING, J.M., CARVER, W.C., TERRACIO, L., BUGGY, J. Proto-oncogene c-fos and the regulation of vasopressin gene expression during dehydration. *Molecular Brain Research* 21: 247-255, 1994.

DOLLARD, J., DOOB, L., MILLER, N., MOWRER, O., SEARS, R. *Frustration and Aggression*. New Haven, Yale University Press, 1939.

DOMPERT, W.U., GLASER, T., TRABER, J. 3H-TVX Q 7821: Identification of 5-HT1 binding sites as target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 328: 467-470, 1985.

DOUCET, J.P., SQUINTO, S.P., BAZAN, N.G. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system. *Molecular Neurobiology* 27-55, 1990.

DOUGLAS, A.J., JOHNSTONE, H., LANDGRAF, R., RUSSEL, J.A., NEUMANN, I.D. The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats. *J. Endocrinol.* 158: 285-293, 1998.

DUGOVIC, C. Role of serotonin in sleep mechanisms. *Rev. Neurol. (Paris)* 157: S16–S19, 2001.

EBERT, D., EBMEIER, K.P. The role of the cingulate gyrus in depression: from functional anatomy to neurochemistry. *Biol. Psychiatry* 39: 1044–1050, 1996.

EICHELMAN, B.S. Neurochemical and psychopharmacologic aspects of aggressive behavior. *Annual Review of Medicine*, 41: 149-158, 1990.

EICHELMAN, B.S. Aggressive behavior: from laboratory to clinic. *Archives of General Psychiatry* 49: 448-492, 1992.

ELSTON, G.N. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. *Cereb. Cortex*, 13: 1124–1138, 2003.

ENGEL, G., GOTHERT, M., HOYER, D. et al., Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5-HT_{1B} binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332: 1–7, 1986.

ERSKINE, M.S., BARFIELD, R.J., GOLDMAN, B.D. Intra-specific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 23:206-218, 1978.

EVENDEN, J.L., RYAN, C.N. The pharmacology of impulsive behaviour in rats: the effects of drugs on response choice with varying delays of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 128: 161–170, 1996.

EVENDEN, J. L. Impulsivity: a discussion of clinical and experimental findings. *J Psychopharmacol* 13: 180-192, 1999.

FEBO, M., SHIELDS, J., FERRIS, C.F., KING, J.A. Oxytocin modulates unconditioned fear response in lactating dams: An fMRI study. *Brain Research* 1302: 183-193, 2009.

FLANNELLY, K., FLANNELLY, L., LORE, R. Postpartum aggression against male conspecifics in Sprague-Dawley rats. *Behav Proc* 13: 279–86, 1986.

FLANNELLY, K., KEMBLE, E.D. The effect of pup presence and intruder behavior on maternal aggression in rats. *Bull Psychonom Soc* 25: 133–5, 1988.

FACCIDOMO, S., BANNAI, M., van TRIGT, R.L., MICZEK, K.A. Alcohol-heightened aggression and corticolimbic 5-HT in mice: infusion and reverse microdialysis of 5-HT_{1B} agonists into the infralimbic and orbitofrontal cortex. *Online Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Society for Neuroscience, Washington, DC, 2005.

FACCIDOMO, S., BANNAI, M., MICZEK, K.A. Escalated aggression after alcohol drinking in male mice: dorsal raphe and prefrontal cortex serotonin and 5-HT_{1B} Receptors. *Neuropsychopharmacology* 33: 2888-2899, 2008.

FACTOR, E.M., MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Preventing suckling-induced release of oxytocin does not inhibit maternal aggression in lactating rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 652: 423-424, 1990.

- FACTOR, E.M., MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behav Neurosci* 107: 166–85, 1993.
- FAIRBANKS, L.A., MELEGA, W.P., JORGENSEN, M.J., KAPLAN, J.R., MCGUIRE, M.T. Social impulsivity inversely associated with CSF 5-HIAA and fluoxetine exposure in vervet monkeys. *Neuropsychopharmacology* 24: 370-378, 2001.
- FALLON, J.H., OPOLE, I.O., POTKIN, S.G. The neuroanatomy of schizophrenia; circuitry and neurotransmitter systems. *Clin. Neurosci. Res.* 3: 77–107, 2003.
- FAVA, M. Psychopharmacologic treatment of pathologic aggression. *Psychiatr Clin North Am* 20:427-51, 1997.
- FEHON, D.C., GRILO, C.M., LIPSCHITZ, D.S. Correlates of community violence exposure in hospitalized adolescents. *Compr. Psychiatry* 42: 283–290, 2001.
- FENELON, V.S., POULAIN, D.A., THEODOSIS, D.T. Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 53: 77–89, 1993.
- FERNANDEZ-GUASTI, A., ESCALANTE, A L., AHLENIUS, S., HILLEGART, V., LARSON, K. Stimulation of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1B} receptors in brain regions and its effects on male rat sexual behaviour. *Eur J Pharmacol* 210: 121-129, 1992.
- FERRARI, P.F., VAN ERP, A.M.M., TORNATZKY, W., MICZEK, K.A. Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *Eur J Neurosci* 17: 371-378, 2003.
- FERRARI, P.F., PALANZA, P., PARMIGIANI, S., DE ALMEIDA, R.M.M., MICZEK, K.A. Serotonin and aggression behavior in rodents and nonhuman primates: predispositions and plasticity. *European Journal of Pharmacology* 526: 259-273, 2005.
- FERREIRA, A., DAHLOF, L.G., HANSEN, S. Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 101: 709–17. see also p. 746, 1987.
- FERREIRA, A., PICAZO, O., URIARTE, N., PEREIRA, M., GUASTI-FERNÁNDEZ, A. Inhibitory effect of buspirone and diazepam, but not of 8-OH-DPAT, on maternal behavior and aggression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 66: 389-396, 2000.
- FERREIRA, A., PEREIRA, M., AGRATI, D., URIARTE, N., FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol. Behav.* 77: 197–204, 2002.

FERREIRA, M.D., MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of dorsal raphe nucleus 5-HT(1A) and 5-HT(2) receptors in tonic immobility modulation in guinea pigs. *Brain Res.* 1285: 69-76, 2009.

FERRIS, C.F., LU, S.F., MESSENGER, T., GUILLON, C.D., HEINDEL, N., MILLER, M., KOPPEL, G., BRUNS, F.R., SIMON, N.G. Orally active vasopressin V1a receptor antagonist, SRX251, selectively blocks aggressive behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83: 169-174, 2006.

FERRIS, C.F., STOLBERG, T., TULKARNI, P., MURUGAVEL, M., BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C., FEBO, M., BREWARD, M., SIMON, N.G. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neurosci.* 9: 111, 2008.

FISH, E.W., FACCIDOMO, S., MICZEK, K.A. Aggression heightened by alcohol or social instigation in mice: reduction by the 5-HT1B receptor agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 146: 391-399, 1999.

FLANNELLY, K.J., FLANNELLY, L. Time course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 101: 101-3, 1987.

FLEMING, A.S., ROSENBLATT, J. Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86: 957-972, 1974.

FLEMING, A.S., LUEBKE, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol. Behav.* 27: 863-868, 1981.

FONTA, C., GASCUEL, J., MASSON, C. Brain FOS-like expression in developing and adult honeybees. *Neuroreport.* 6: 745-9, 1995.

FULWILER, C., ECKSTINE, J., KALSY, S. Impulsive-aggressive traits, serotonin function, and alcohol-enhanced aggression. *J Clin Pharmacol* 45: 94-100, 2005.

FUSTER, J.M. In: Placito M. and Bialer M. (Eds.), *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe* (3rd edn.). Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. 1997.

GAIDDON, C., LOEFFLER, J.P., LARMET, Y. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *Journal of Neurochemistry* 66: 2279-2286, 1996.

GAMALLO, A., VILLANUA, A., TRANCHO, G., FRAILE, A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiol Behav* 36: 217-21, 1986.

GAMMIE, S.C., NELSON, R.J. Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 19: 8027-35, 1999.

GAMMIE, S.C., NELSON, R.J. cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Res* 898: 232–41, 2001.

GAMMIE, S.C., NEGRON, A., NEWMAN, S.M., RHODES, J.S. Corticotropin-releasing factor inhibits maternal aggression in mice. *Behav Neurosci* 118: 805–14, 2004.

GAMMIE, S.C. Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. *Behav Cognitive Neurosci Rev* 4: 119–135, 2005.

GAMMIE, S.C., GARLAND JUNIOR, T., STEVENSON, S.A. Artificial Selection for Increased Maternal Defense Behavior in Mice *Behav Genet* 36: 713–722, 2006.

GAMMIE, S.C., STEVENSON, S.A. Effects of Daily and Acute Restraint Stress During Lactation on Maternal Aggression and Behavior in Mice. *Stress* 9: 171–180, 2006.

GHOSH, A., GINTY, D.G., BADING, H., GREENBERG, M.E. Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *Journal of Neurobiology* 25: 294–303, 1994.

GIOVENARDI, M., PADOIN, M.J., CADORE, L.P., LUCION, A.B. Hypothalamic paraventricular nucleus, oxytocin, and maternal aggression in rats. *Ann N Y Acad Sci* 807: 606–9, 1997.

GIOVENARDI, M., PADOIN, M.J., CADORE, L.P., LUCION, A.B. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol Behav* 63: 351–9, 1998.

GIOVENARDI, M., DE AZEVEDO, M.S., DA SILVA, S.P., HERMEL, DO E., M GOMES, C.M., LUCION, A.B. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. *Physiol Behav* 86: 209–17, 2005.

GOLDEN, C.J., JACKSON, M.L., PETERSON-ROHNE, A., GONTKOVSKY, S.T. Neuropsychological correlates of violence and aggression: a review of the clinical literature. *Aggress Violent Behav* 1: 3–25, 1996.

GOLDMAN-RAKIC, P.S., SELEMON, L.D., SCHATZ, M.L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience*, 12: 719–743, 1984.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 46: 650–661, 1999.

GONZALES, G.A., MONTMINY, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675–680, 1989.

GORDON, N.S., KOLLACK-WALKER, S., AKIL, H., PANKSEPP, J. Expression of c-fos gene activation during rough and tumble play in juvenile rats. *Brain Res Bull* 57: 651–9, 2002.

GRAFMAN J., SCHWAB K., WARDEN D., PRIDGEN BS., BROWN HR. Frontal lobe injuries, violence and aggression: A report of the Vietnam head injury study. *Neurology* . 46: 1231-1238, 1996.

GREGG, T.R., SIEGEL, A. Brain structures and neurotransmitters regulating aggression in cats: implications for human aggression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 25: 91-140, 2001.

GREENBERG, M.E., ZIFF, E.B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311: 433-438, 1984.

GRIEBEL, G., SAFFROY-SPITTLER, M., MISLIN, R., VOGEL, E., MARTIN, J.R. Serenics fluprazine (DU 27716) and eltoprazine (DU 28853) enhance neophobic and emotional behaviour in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 102: 498-502, 1990.

GROTA, L.J., ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. *Horm Behav* 5: 275-82, 1974.

HAAS, D. Participação da amígdala medial pósterio-dorsal no comportamento agressivo de ratos: expressão da proteína Fos e efeito da microinjeção de somatostatina. Dissertação de mestrado. Orientador: Dr. Alberto Antonio Rasia Filho. Co-orientadora: Dra. Márcia Giovenardi. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre. 2009.

HAJÓS, M., RICHARDS, C.D., SZEKELY, A.D., SHARP, T. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87: 95–108, 1998.

HALASZ, J., LIPOSITS, Z., MEELIS, W., KRUK, M.R., HALLER, J. Hypothalamic attack area-mediated activation of the forebrain in aggression. *Neuroreport* 13: 1267–70, 2002.

HALÁSZ, J., TÓTH, M., KALLÓ, I., LIPOSITS, Z., HALLER, J. The activation of prefrontal cortical neurons in aggression - A double labeling study *Behavioural Brain Research* 175: 166–175, 2006.

HALLER, J., VAN DE SCHRAAF, J., KRUK, M.R. Deviant forms of aggression in glucocorticoid hyporeactive rats: a model for 'pathological' aggression? *J. Neuroendocrinol.* 13: 102–107, 2001.

HALLER, J., HALASZ, J., MIKICS, E., KRUK, M.R. Chronic glucocorticoid deficiency-induced abnormal aggression, autonomic hypoarousal, and social deficit in rats. *J. Neuroendocrinol.* 16: 550–557, 2004.

HALLER, J., TÓTH, M., HALASZ, J. The activation of raphe serotonergic neurons in normal and hypoarousal-driven aggression: A double labeling study in rats. *Behavioural Brain Research* 161: 88–94, 2005.

HALLER, J., TÓTH, M., HALASZ, J., DE BOER, S.F. Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiology & Behavior* 88: 173–182, 2006.

HAMON, M.C., COSSERY, J.M., SPAMPINATO, U., GOZLAN, H. Are there selective ligands for 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor bonding sites? *Trends Pharmacol Sci* 7: 336-338, 1986.

HAMON, M., FATTACCINI, C.M., ADRIEN, J., GALLISSOT, M.C., MARTIN, P., GOZLAN, H. Alterations of central serotonin and dopamine turnover in rats treated with ipsapirone and other 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists with potential anxiolytic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 745-752, 1988.

HANLEY, M.R. Proto-oncogenes in the nervous system. *Neuron* 1:175–82, 1988.

HANSEN, S., FERREIRA, A. Effects of bicuculline infusions in the ventromedial hypothalamus and amygdaloid complex on food intake and affective behavior in mother rats. *Behav Neurosci* 100: 410–5, 1986.

HANSEN, S. Medial hypothalamic involvement in maternal aggression of rats. *Behav Neurosci* 103: 1035–46, 1989.

HARD, E., HANSEN, S. Reduced fear behavior in the lactating rat. *Physiol. Behav.* 33: 641–643, 1985.

HARDINGHAM, G.E., CHAWLA, S., JOHNSON, C.M., BADING, H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385: 260-265, 1997.

HARRIS J.A. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 45: 1-8, 1998.

HARRISON, A.A., EVERITT, B.J., ROBBINS, T.W. Central 5-HT depletion enhances impulsive responding without affecting the accuracy of attentional performance: interactions with dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Ber)* 133: 329-342, 1997.

HASEGAWA, S., WATANABE, A., NISHI, K., NGUYEN, K.Q., DIKSIC, M. Selective 5-HT_{1B} receptor agonist reduces serotonin synthesis following acute, and not chronic, drug

administration: results of an autoradiographic study. *Neurochemistry International* 46: 261-272, 2005.

HASEN, N.S., GAMMIE, S.C. Differential fos activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. *Physiology & Behavior* 84: 681–695, 2005.

HAUG, M., WALLIAN, L., BRAIN, P.F. Effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine on activity and attack by female mice towards lactating intruders. *Gen Pharmacol* 21: 845-849, 1990.

HAWKINS, K.A., TROBST, K.K. Frontal lobe dysfunction and aggression: conceptual issues and research findings. *Aggress Violent Behav* 5: 147–57, 2000.

HEINRICHS, M., MEINLSCHMIDT, G., NEUMANN, I., WAGNER, S., KIRSCHBAUM, C., EHLERT, U., HELLHAMMER, D.H. Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4798–4804, 2001.

HEINRICHS, M., NEUMANN, I., EHLERT, U. Lactation and stress: protective effects of breast-feeding in humans. *Stress* 5: 195–203, 2002.

HEN, R. Of mice and flies—commonalities among 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 160–165, 1992.

HENSLER, J.G., KOVACHICH, G.B., FRAZER, A. A quantitative autoradiographic study of serotonin_{1A} receptor regulation. Effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropsychopharmacology* 4: 131–44, 1991.

HERDEGEN, T., KOVARY, K., LEAH, J., BRAVO, R. Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol* 313: 178–91, 1991.

HIGLEY, J.D., MEHLMAN, P.T., TAUB, D.M., HIGLEY, S.B., SUOMI, S.J., VICKERS, J.H., LINNOILA, M. Cerebrospinal fluid monoamine and adrenal correlates of aggression in free-ranging rhesus monkeys. *Arch Gen Psychiatry* 49: 436–441, 1992.

HIGLEY, J.D., MEHLMAN, P.T., POLAND, R.E., TAUB, D.M., VICKERS, J.H., SUOMI, S.J., LINNOILA, M. CSF testosterone and 5-HIAA correlate with different types of aggressive behaviors. *Biol. Psychiatry* 40: 1067–1082, 1996.

HIGLEY, J.D. *Primate psychology*. Harvard University Press, Massachusetts, 2003.

HILLEGART, V. Functional topography of brain serotonergic pathways in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 142: 2-54, 1991.

HJÖRTH, S., SHARP, T. Effect of the 5-HT(1) receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by (in vivo) microdialysis. *Life Sci* 48: 1779-1786, 1991.

HYDE, J.S., SAWYER, T.F. Selection for agonistic behavior in wild female mice. *Behav Genet* 10: 349-359, 1980.

HORN, N.R., DOLAN, M., ELLIOTT, R., DEAKIN, J.F.W., WOODRUFF, P.W.R. Response inhibition and impulsivity: an fMRI study. *Neuropsychologia* 41: 1959-1966, 2003.

HOYER, D., ENGEL, G., KALKMAN, H.O. Characterization of the 5-HT_{1B} recognition site in rat brain: binding studies with [¹²⁵I]iodocyanopindolol. *Eur J Pharmacol* 118: 1-12, 1985.

HOYER, D., MIDDLEMISS, D.N. Species-differences in the pharmacology of terminal 5-HT autoreceptors in mammalian brain. *Trends Pharmacol Sci* 10: 130-132, 1989.

HOYER, D., CLARKE, D.E., FOZARD, J.R., HARTIG, P.R., MARTIN, G.R., MYLECHARANE, E.J. et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacology* Ver 46: 157-203, 1994.

HOYER, D., HANNON, J.P., MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533-54, 2002.

HUCKLEBRIDGE, F.H., NOWELL, N.W. Plasma catecholamine response to physical and psychological aspects of fighting in mice. *Physiol Behav* 13: 35-40, 1974.

HUGHES, P., LAWLOR, P., DRAGUNOW, M. Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Molecular Brain Research* 13: 355-357, 1992.

IKEDA, J., NAKAJIMA, T., OSBORNE, O.C., MIES, G., NOWAK, T.S. JR. Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: Induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Molecular Brain Research* 26: 249-258, 1994.

IMAKI, T., SHIBASAKI, T., HOTTA, M., DEMURA, H. Intracerebroventricular administration of corticotrophin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Research* 616: 114-125, 1993.

INSEL, T.R. Postpartum increases in brain oxytocin binding. *Neuroendocrinology* 44: 515-8, 1986.

ISON, M., FACHINELLI, C., RODRIGUEZ ECHANDIA, E.L. Effect of the i.c.v. injection of 5,7-di-hydroxytryptamine on the aggressive behavior of dominant and submissive pigeons (*Columba livia*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53: 951-955, 1996.

JACOBS, B.L., FORMAL, C.A. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol. Rev.* 43: 563–578, 1991.

JACOBS, B.L., AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72: 165–229, 1992.

JACOBS, B.L., FORMAL, C.A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21: 9S–15S, 1999.

JOHNSON, O., BECNEL, J., NICHOLS, C.D. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A}-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience* 158:1292-1300, 2009.

JOHNSTONE, H.A., WIGGER, A., DOUGLAS, A.J., NEUMANN, I.D., LANDGRAF, R., SECKL, J.R., RUSSEL, J.A. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J. Neuroendocrinol.* 12: 811-822, 2000.

JOINER, J.R., BROWN, J.S., WINGATE, L.R. The psychology and neurobiology of suicidal behavior. *Annu Rev Psychol* 56: 287–314, 2005.

JOPPA, M.A., ROWE, R.K., MEISEL, R.L. Effects of serotonin 1A or 1B receptor agonists on social aggression in male and female Syrian hamsters. *Pharmacol Biochem Behav* 58: 349-353, 1997.

KALÉN, P., WIKLUND, L. Projections from the medial septum and diagonal band of Broca to the dorsal and central superior raphe nuclei: a non-cholinergic pathway. *Exp Brain Res* 75: 401-416, 1989.

KAMMERER, M., ADAMS, D., VON CASTELBERG, B., GLOVER, V. Pregnant women become insensitive to cold stress. *BMC Pregnancy Childbirth* 2: 8, 2002.

KAVOUSSI, R.J., LIU, J., COCCARO, E.F. An open trial of sertraline in personality disordered patients with impulsive aggression. *J Clin Psychiatry* 55: 137-141, 1994.

KAVOUSSI, R., ARMSTEAD, P., COCCARO, E. The neurobiology of impulsive aggression. *Psychiatr Clin North Am* 20: 395-403, 1997.

KAIYALA, K.J., VINCOW, E.S., SEXTON, T.J., NEUMAIER, J.F. 5-HT_{1B} receptor Mrna levels in dorsal raphe nucleus: inverse association with anxiety behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75: 769–776, 2003.

KELLY, D.D. The experimental imperative: laboratory analyses of aggressive behaviors. In: Frazier SH (ed), *Aggression*. Research Publications Association for Research in Nervous and Mental Diseases. Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1974.

KENDLER, K.S. Gender differences in the genetic epidemiology of major depression. *J. Genet.-Specif. Med.* 1: 28–31, 1998.

KENNETT, G.A., DOURISH, C.T., CURZON, G. 5-HT_{1B} agonists induce anorexia at a postsynaptic site. *Eur J Pharmacol* 141: 429-435, 1987.

KHERAMIN, S., BODY, S., HERRERA, F.M., BRADSHAW, C.M., SZABADI, E., DEAKIN, J.F., ANDERSON, I.M. The effect of orbital prefrontal cortex lesions on performance on a progressive ratio schedule: implications for models of inter-temporal choice. *Behav Brain Res* 156: 145-152, 2005.

KIA, H.K., BRISORGUEIL, M.J., DAVAL, G. et al. Serotonin 5-HT_{1A} receptors expressed by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat medial septum and diagonal band of Broca - a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 74: 143–154, 1996.

KNOBELMAN, D.A., KUNG, H.F., LUCKI, I. Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT (1A) and 5-HT (1B) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1111-1117, 2000.

KNYSHEVSKI, I., CONNOR, D.F., HARRISON, R.J., RICCI, L.A., MELLONI, R.H. JR. Persistent activation of select forebrain regions in aggressive, adolescent cocaine-treated hamsters *Behavioural Brain Research* 159: 277–286, 2005.

KOLLACK-WALKER, S., NEWMAN, S.W. Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience* 66: 721–36, 1995.

KOLUNIE, J.M., STERN, J.M. Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Horm. Behav.* 29: 492-518, 1995.

KOLLACK-WALKER, S., NEWMAN, S.W. Mating-induced expression of c-fos in the male Syrian hamster brain: role of experience, pheromones, and ejaculations. *J Neurobiol* 32: 481–501, 1997.

KOOLHAAS, J.M., DE BOER, S.F., RUITER, A.J.H., MEERLO, P., SGOIFO, A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol. Scand.* 69: 69–72, 1997.

KOUTOKU, T., ZHANG, R., TACHIBANA, T., OSHIMA, Y., FURUSE, M. Effect of acute L-tryptophan exposure on the brain serotonergic system and behavior in the male medaka. *Zoolog Sci* 20:121–4, 2003.

KOVÁCS, K.J., SAWCHENKO, P.E. Sequence of stress induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience* 16: 262-273, 1996.

- KOVÁCS, K. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.* 33: 287-297, 1998.
- KOVÁCS, K.J. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond *Journal of Neuroendocrinology* 20: 665–672, 2008.
- KOVACSICS, C.E., GOTTESMAN, I.I., GOULD, T.D. Lithium's antisuicidal efficacy: elucidation of neurobiological targets using endophenotype strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:175-98, 2009.
- KOVACSICS, C.E., GOULD, T.D. Shock-induced aggression in mice is modified by lithium. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 94: 380–386, 2010.
- KRAVITZ, E.A., HUBER, R. Aggression in invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 736–743, 2003.
- KRSIAK, M., BORGESOVA, M. Effect of alcohol on behaviour of pairs of rats. *Psychopharmacology* 32: 201-209, 1973.
- KRUK, M.R. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 527-538, 1991.
- KRUG, E.G., DALBERG, L.L., MERCY, J.A., ZWI, A.B., LOZANO, R. World report on violence and health. Geneva: World Health Organization 2002.
- KUDIELKA, B., KIRSCHBAUM, C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biological Psychology* 69: 113–132, 2005.
- KUNISHIO, K., HABER, S.N. Primate cingulostratial projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J. Comp. Neurol.* 350: 337–356, 1994.
- LAGERSPETZ, K.M.J., HAUTOJARVI, S. The effect of prior aggressive or sexual arousal on subsequent aggressive or sexual reactions in male mice. *Scand J Psychol* 8: 1-6, 1967.
- LAMBÁS-SEÑAS, L., MNIE-FILALI, O., CERTIN, V., FAURE, C., LEMOINE, L., ZIMMER, L., HADDJERI, N. Functional correlates for 5-HT1A receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* doi:10.1016/j.pnpbp.2008.11.017, 2009.
- LARRY, J., SIEVER, M.D. Neurobiology of Aggression and Violence. *Am J Psychiatry* 165: 429–442, 2008.
- LEONARD, B.E., TUIITE, M. Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 251–286, 1981.

LESCOAT, G., MANIEY, J. Lactation and sensitivity to corticotropin axis to stress. *J Physiol (Paris)* 70: 695–708, 1976.

LEUNER, B., SHORS, T.J. Learning during motherhood: A resistance to stress. *Hormones and Behavior* 50: 38–51, 2006.

LIGHTMAN, S.L., YOUNG, W.S.I. Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. *J Physiol* 394: 23–39, 1987.

LIGHTMAN, S.L., YOUNG, W.S. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 124: 2358–2364, 1989.

LIGHTMAN, S.L., WINDLE, R.J., WOOD, S.A., KERSHAW, Y.M., SHANKS, N., INGRAM, C.D. Peripartum plasticity within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Prog Brain Res* 133: 111–129, 2001.

LIN, D., PARSONS, L.H. Anxiogenic-like effect of serotonin(1B) receptor stimulation in the rat elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 581–587, 2002.

LINDGREN, T., KANTAK, K.M. Effects of serotonin receptor agonists and antagonists on offensive aggression in mice. *Aggress Behav* 13: 87-96, 1987.

LINDVALL, O., BJORKLUND, A., DIVAC, I. Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res.* 142: 1–24, 1978.

LINNOILA, M., VIRKKUNEN, M., NUUTILA, A., RIMON, R., GOODWIN, F.K. Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from nonimpulsive violent behavior. *Life Sci* 33: 2609-2614, 1983.

LISTER, R.G., HILAKIVI, L.A. The effects of novelty, isolation, light and ethanol on the social behavior of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 96: 181–187, 1988.

LONSTEIN, J.S., STERN, J.M. Role of the Midbrain Periaqueductal Gray in Maternal Nurture and Aggression: c-fos and Electrolytic Lesion Studies in Lactating Rats. *The Journal of Neuroscience*, 17(9): 3364–3378, 1997.

LONSTEIN, J.S., STERN, J.M. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal and aggressive behaviors in rats. *Brain Res* 804: 21–35, 1998.

LONSTEIN, J.S., SIMMONS, D.A., STERN, J.M. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression, and fearfulness. *Behav. Neurosci.* 112: 1502-1518, 1998.

LONSTEIN, J.L., GAMMIE, S.C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26: 869-888, 2002.

LONSTEIN, J.S. Resolving Apparent Contradictions Concerning the Relationships Among Fear or Anxiety and Aggression During Lactation: Theoretical Comment on D'Anna, Stevenson, and Gammie. *Behavioral Neuroscience* 119: 1165-1168, 2005.

LUCION, A.B., DE ALMEIDA, R.M. Role of the intruder in the aggressive behaviour of colonies of wild rats (*Rattus norvegicus*). In: Olivier B, Mos J, Slangen JL. *Animal models in Psychopharmacology*. Switzerland: Birkhauser 347-56, 1991.

LUCION, A.B., DE ALMEIDA, R.M.M., DA SILVA, R.S. Territorial aggression, body weight, carbohydrate metabolism and testosterone levels of wild rats maintained in laboratory colonies. *Braz J Med Biol Res* 29: 1657-62, 1996.

MALLERET, G., HEN, R., GUILLOU, J.L., SEGU, L., BUHOT, M.C. 5-HT_{1B} receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J Neurosci* 19: 6157-6168, 1999.

MANN, J.J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 21: 99-105, 1999.

MARKOVITZ, P. Pharmacotherapy of impulsivity, aggression and related disorders. In Hollander E, Stein d J (eds), *Impulsivity and aggression*. Jhon Wiley, Chichester, 263-287, 1995.

MARTIN, G.R., HUMPHREY, P.P.A. Classification review: receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology* 33: 261-273, 1994.

MARTINEZ, M., PHILLIPS, P.J., HERBERT, J. Adaptation in patterns of cfos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur J Neurosci* 10: 20-33, 1998.

MATSUDA, S., PENG, H., YOSHIMURA, H., WEN, T.C., FUKUDA, T., SAKANAKA, M. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neurosci Res* 26: 157-70, 1996.

MAURA, G., RAITERI, M. Cholinergic terminals in rat hippocampus possess 5-HT_{1B} receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 333-337, 1986.

MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm. Behav.* 21: 253-267, 1987.

MAYER, A.D., MONROY, A.M., ROSENBLATT, J.S. Prolonged estrogenprogesterone

treatment of nonpregnant ovariectomized rats: factors stimulating home-cage and maternal aggression and short-latency maternal behavior. *Horm. Behav.* 24: 342-364, 1990.

MCKENZIE-QUIRK, S.D., GIRASA, K.A., ALLAN, A.M., MICZEK, K.A. 5-HT₃ receptors, alcohol and aggressive behavior in mice. *Behav Pharmacol* 16: 163-170, 2005.

MCMILLEN, B.A., DA VANZO, E.A., SCOTT, S.M., SONG, A.H. N-alkyl-substituted aryl-piperazine drugs: Relationship between affinity for serotonin receptors and inhibition of aggression. *Drug Dev Res* 12: 53-62, 1988.

MEHLMAN, P.T., HIGLEY, J.D., FAUCHER, I., LILLY, I.I., TAUB, D.M., VICKERS, MENESES, A. 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 1111-1125, 1999.

MENDOZA, D.L., BRAVO, H.A., SWANSON, H.H. Antiaggressive and anxiolytic effects of gepirone in mice, and their attenuation by WAY 100635. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 499-509, 1999.

METCALF, M.A., MCGUFFIN, R.W., HAMBLIN, M.W. Conversion of the human 5-HT_{1D} beta serotonin receptor to the rat 5-HT_{1B} ligand-binding phenotype by Thr355Asn site directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol* 44: 1917-20, 1992.

MICZEK, K.A., BARRY, III, H. Effects of alcohol on attack and defensive-submissive reactions in rats. *Psychopharmacology* 52: 231-237, 1977.

MICZEK, K.A., O'DONNELL, J.M. Alcohol and chlordiazepoxide increase suppressed aggression in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 69: 39-44, 1980.

MICZEK, K.A., WEERTS, E.M., TORNATZKY W., De BOLD, J.F., VATNE, T.M. Alcohol and "bursts" of aggressive behaviour: ethological analyses of individual differences in rats. *Psychopharmacology* 107: 551-563, 1992.

MICZEK, K.A., WEERTS, E.M., DEBOLD, J.F. Alcohol, benzodiazepine-GABAA receptor complex and aggression: ethological analysis of individual differences in rodents and primates. *J Stud Alcohol* 11: 170-179, 1993.

MICZEK, K.A., WEERTS, E., HANEY, M., TIDEY, J. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. *Neuroscience, Biobehavioral Review* 18: 97-110, 1994.

MICZEK, K.A., DE BOLD, J.F., VAN ERP, A.M., TORNATZKY, W. Alcohol, GABAA-benzodiazepine receptor complex, and aggression. *Recent Dev. Alcohol.* 13: 139-171, 1997.

MICZEK, K.A.; HUSSAIN, S.; FACCIDOMO, S. Alcohol-heightened aggression in mice: attenuation by 5-HT_{1A} receptor agonists. *Psychopharmacology* 139: 160-168, 1998.

MICZEK, K.A. Research on animal aggression: emerging successes for understanding determinants of human violence. In: Carrol M.E, Overmier, J.B (eds) *Animal research and human health: advancing human welfare through behavioral science*. American Psychological Association, Washington, 2001.

MICZEK, K.A., DE ALMEIDA, R.M.M.A. Oral drug self-administration in the home cage of mice: alcohol-heightened aggression and inhibition by the 5-HT_{1B} agonist anpirtoline. *Psychopharmacology* 157: 421-429, 2001.

MICZEK, K.A., FISH, E.W., DE ALMEIDA, R.M.M., FACCIDOMO, S., DEBOLD, J.F. Role of alcohol consumption in escalations to violence. *Ann NY Acad Sci* 1036: 278–289, 2004.

MICZEK, K.A., DE ALMEIDA, R.M.M., KRAVITZ, E.A., RISSMAN, E.F., DE BOER, S.F., RAI, A. Neurobiology of escalated aggression and violence. *J Neurosci* 27: 11803-6, 2007.

MILLAN, M.J., PERRIN-MONNEYRON, S. Potentiation of fluoxetine-induced penile erections by combined blockade of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *Eur J Pharmacol*. Mar 321: R11-3, 1997.

MILLAN, M.J., NEWMAN-TANCREDI, A., LOSHON, S., TOUZARD, M., AUBRY, S., AUDINOT, V. Specific labelling of serotonin 5-HT_{1B} receptors in rat frontal cortex with the novel, phenylpiperazine derivate, [³H]GR 125,743 a pharmacological characterization. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71: 589-598, 2002.

MIQUEL, M.C., DOUCET, E., RIAD, M., ADRIEN, J., VERGE, D., HAMON, M. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 14: 357-362, 1992.

MIYATA, S., NAKASHIMA, T., KIYOHARA, T. Expression of c-fos immunoreactivity in the hypothalamic magnocellular neurons during chronic osmotic stimulations. *Neurosci Lett* 175: 63–6, 1994.

MOBINI, S., CHIANG, T.J., HO, M.Y., BRADSHAW, C.M., SZABADI, E. Effects of central 5-hydroxytryptamine depletion on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 152: 390-397, 2000.

MOFFITT, T.E., ARSENEAULT, L., JAFFEE, S.R., KIM-COHEN, J., KOENEN, K.C., ODGERS, C.L., SLUTSKE, W.S., VIDING, E. Research review: DSM-V conduct disorder: research needs for an evidence base. *J Child Psychol Psychiatry* 49: 3-33, 2008.

MONASTERIO, N., RAMOS, E., MORALES, T. Changes in c-Fos and NOS expression in the PVH of lactating rats in response to excitotoxicity and stress. *Ann N Y Acad Sci*. 1148: 161-4, 2008.

MORGAN, J.I., CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421–51, 1991.

MORGAN, J.I., CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes *TINS* 12: 459–462, 1989.

MORGANE, P.J., GALLER, J.R., MOKLER, D.J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology* 75: 143–160, 2005.

MOYER, K.E. kinds of aggression and their physiological basis. *Communications in Behavioral Biology* A2, 65–67, 1968.

MUCIGNAT-CARETTA, C., BONDI, M., CARETTA, A. Animal models of depression: olfactory lesions affect amygdala, subventricular zone, and aggression. *Neurobiol. Dis.* 16: 386–395, 2004.

MUEHLENKAMP, F., LUCION, A., VOGEL, W.H. Effects of selective serotonergic agonists on aggressive behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 671–674, 1995.

MURDOCH, D., PIHL, R.O., ROSS, D. Alcohol and crimes of violence: present issues. *Int J Addict* 25: 1065–1081, 1990.

MYERS, M.M., DENENBERG, V.H., THOMAN, E., HOLLOWAY, W.R., BOWERMAN, R.R. The effects of litter size on plasma corticosterone and prolactin response to ether stress in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 19: 54–58, 1975.

NARANJO J.R. et al. Molecular pathways of pain: Fos/Junmediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. *Neuron* 6: 607–617, 1991 a.

NARANJO J.R., MELLSTRÖM, B., ACHAVAL, M., LUCAS, J.J., DEL RIO, J., SASSONE-CORSI, P. Co-induction of jun B and c-fos in a subset of neurons in the spinal cord. *Oncogene* 6: 223–7, 1991 b.

NELSON, R.J., CHIAVEGATTO, S. Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci* 24: 713–719, 2001.

NELSON, R.J., TRAINOR B.C. Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci.* 8(7): 536–46, 2007.

NEPHEW, B., BRIDGES, R.S. Central actions of arginine vasopressin and a V1a receptor antagonist on maternal aggression, maternal behavior, and grooming in lactating rats *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 91: 77–83, 2008.

NEUMANN, I.D., JOHNSTONE, H.A., HATZINGER, M., LIEBSCH, G., SHIPSTON, M., TUSSEL, J.A., LANDGRAF, R., DOUGLAS, A.J. Attenuated neuroendocrine

responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involves adenohipophysial changes. *J. Physiol.* 508: 289–300, 1998.

NEUMANN, I.D., KRÖMER, S.A., OHL, F., TORNER, L., TOSCHI, N. Maternal defeat: an emotional stressor for female rats to study neuroendocrine adaptations in lactation. *Eur. J. Neurosci.* 12 (Suppl.11): 416, 2000.

NEUMANN, I.D., TOSCHI, N., OHL, F., TORNER, L., KRÖMER, S.A. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin *European Journal of Neuroscience* 13: 1016-1024, 2001.

NEUMANN, I.D., VEENEMA, A.H., BEIDERBECK, D.I. Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 1-16, 2010.

NEW, A.S., TRESTMAN, R.L., MITROPOULOU, V., BENISHAY, D.S., COCCARO, E., SILVERMAN, J., SIEVER, L.J. Serotonergic function and self-injurious behavior in personality disorder patients. *Psychiatry Res* 69: 17–26, 1997.

NIKULINA, E.M., AVGUSTINOVICH, D.F., POPOVA, N.K. Role of 5HT1A receptors in a variety of kinds of aggressive behavior in wild rats and counterparts selected for low defensiveness towards Man. *Aggress Behav* 18: 357-364, 1992.

NEWMAN, S. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. NY Acad. Sci.* 877: 242–257, 1999.

NUMAN, M. Maternal Behavior. In.: KNOBIL, E. & NEILL, J. The physiology of reproduction. Raven Press, New York. p. 1569-1645, 1988.

NUMAN, M., INSEL, T.R. The neurobiology of parental behavior. New York: Springer-Verlag, 2003.

O'CONNOR, J.J., KRUK, Z.L. Effects of 21 days treatment with fluoxetine on stimulated endogenous 5-hydroxytryptamine overflow in the rat dorsal raphe and suprachiasmatic nucleus studied using fast cyclic voltammetry in vitro. *Brain Res*, 640: 328-335, 1994.

OKSENBERG, D., MASTERS, S.A., O'DOWD, B.F., JIN, H., HAVLIK, S., PEROUTKA, S.J. et al. A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT1B receptors. *Nature* 360: 161-163, 1992.

OLIVIER, B., MOS, J., VAN DER HEYDEN J., HARTOG, J. Serotonergic modulation of social interaction in isolated male mice. *Psychopharmacology* 97: 154-156, 1989 a.

OLIVIER, B., MOS, J., TULP, M., SCHIPPER, J., BEVAN, P. Modulatory action of serotonin in aggressive behaviour. In: Bevan P, Cools AR, Archer T. *Behavioural Pharmacology of 5-HT*. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates 89-115, 1989 b.

OLIVIER, B., MOS, J., VAN DER HEYDEN, J., HARTOG, J. Serotonergic modulation of social interactions in isolated male mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 97: 154-6, 1989 a.

OLIVIER, B.; MOS, J. Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 16: 847-870, 1992.

OLIVIER, B., MOS, J., TULP, M.T.M., VAN DER POEL, A.M. Animal models of anxiety and aggression in the study of serotonergic agents. In: Langer SZ (ed) *Serotonin receptor subtypes: Pharmacological significance and clinical implications*. Karger, Basel, pp 67-79, 1992.

OLIVIER, B., J. Van OORSCHOT R., HEN, R. Serotonin receptors and animal models of aggressive behavior. *Pharmacopsychiatry* 28: 80-90, 1995.

OLIVIER, B. Serotonin and aggression. *Ann. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1036: 382-392, 2004.

OLIVIER, B., Van OORSCHOT R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: A review. *European Journal of Pharmacology* 526: 207-217, 2005.

OVERLI, O., HARRIS, C.A., WINBERG, S. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.* 54: 263-275, 1999.

PABIS, D.J., STANISLAV, S.W. Pharmacotherapy of aggressive behavior. *Ann Pharmacother* 30: 278-287, 1996.

PARENT, A., DESCARTES, L., BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6: 115-38, 1981.

PAUL, L., GRONEK, J., POLITCH, J. Maternal aggression in mice: protection of young is a by-product of attacks at the home site. *Agg Behav* 6: 19-29, 1981.

PAZOS, A., PALACIOS, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 343: 403-408, 1985.

PAYNE, A.P., ANDREWS, M.J., WILSON, C.A. Housing, fighting and biogenic amines in the midbrain and hypothalamus of the golden hamster. In: Miczek KA (ed), *Ethopharmacological Aggression Research*. New York, Alan R. Liss, 1984.

PEDIGO, N.W., YAMAMURA, H.I., NELSON, D.L. Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem* 36: 220-226, 1981.

PEEKE, H.V.S., ELLMAN, G.E., HERZ, M.J. Dose dependent alcohol effects on the aggressive behavior of the conflict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Behav Biol* 8: 115-122, 1973.

- PEEKE, H.V.S., FIGLER, M.H. Modulation of aggressive behavior in fish by alcohol and congeners. *Pharmacol Biochem Behav* 14: 79-84, 1981.
- PEREIRA, M., URIARTE, N., AGRATI, D., ZULUAGA, M.J., FERREIRA, A. Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. *Psychopharmacology* 180: 241-248, 2005.
- PEYRON, C., LUPPI, P.H., KITAHAMA, K., FORT, P., HERMANN, D.M., JOUVET, M. Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. *NeuroReport* 6: 2527-2531, 1995.
- PEYRON, C., LUPPI, P.H., RAMPON, C., JOUVET, M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 364: 402-413, 1996.
- PEYRON, C., PETIT, J.M., RAMPON, C., JOUVET, M., LUPPI, P.H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-468, 1998.
- PIÑEYRO, G., BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51: 533-91, 1999.
- PLUTCHIK, R., VAN PRAAG, H.M. The measurement of suicidality. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 13: 23-34, 1989.
- PLUTCHIK, R., VAN PRAAG, H.M. The nature of impulsivity: Definitions, ontology, genetics, and relations to aggression. In E. Hollander, & D. Stein (Eds.). *Impulsivity and Aggression* (pp. 7-24). New York: Wiley, 1995.
- POMPEIANO, M., PALACIOS, J.M., MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12: 440-453, 1992.
- POPESKI, N., WOODSIDE, B. Central nitric oxide synthase inhibition disrupts maternal behavior in the rat. *Behav Neurosci* 118: 1305-16, 2004.
- POTEGAL, M., TENBRINK, L. Behavior of attack-primed and attack-satiated female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Psychol* 98: 66-75, 1984.
- POTEGAL, M. Attack priming and satiation in female golden hamsters: tests of some alternatives to the aggression arousal interpretation. *Aggress Beh* 17: 327-335, 1991.
- POTEGAL, M. Time course of aggressive arousal in female hamsters and male rats. *Behav Neural Biol* 58: 120-124, 1992.

POTEGAL, M., FERRIS, C.F., HEBERT, M., MEYERHOFF, J., SKAREDOFF, L. Attack priming in female Syrian golden hamsters is associated with a c-fos coupled process within the corticomedial amygdala. *Neuroscience* 75: 869–80, 1996 a.

POTEGAL, M. HEBERT, M., DE COSTER, M., MEYERHOFF, J.L. Brief, high frequency stimulation of the corticomedial amygdala induces a delayed and prolonged increase of aggressiveness in male Syrian golden hamsters. *Behav Neurosci* 110: 401–12, 1996 b.

PUUMALA, T., SIRVIÖ, J. Changes in activities of dopamine and serotonin systems in the frontal cortex underlie poor choice accuracy and impulsivity of rats in an attentional task. *Neuroscience* 83: 489-499, 1998.

RAINE A., BUCHSHAUM MS., STANLEY J., LOTTENBERG S., ABEL L., STODDARD J. Selective reductions in prefrontal glucose metabolism in murderers. *Biol. Psychiatry*. 36: 365-373, 1994.

RAMBOZ, S., SAUDOU, F., AMARA, D.A., BELZUNG, C., SEGU, L., MISSLIN, R., BUHOT, M.C., HEN, R. 5-HT_{1B} receptor knock out - Behavioral consequences. *Behav Brain Res* 73: 305-312, 1995.

RAMBOZ, S., SAUDOU, F., AMARA, D.A., BELZUNG, C., SEGU, L., MISSLIN, R. et al. 5-HT_{1B} receptor knock out-behavioral consequences. *Behav Brain Res* 73: 305-12, 1996.

RATEY, J., SOVNER, R., PARKS, A., ROGENTINE, K. Buspirone treatment of aggression and anxiety in mentally retarded patients: a multiple-baseline, placebo lead-in study. *J Clin Psychiatry* 52: 159-162, 1991.

REN, L., LI, X., WENG, Q., TRISOMBOON, H., YAMAMOTO, T., PAN, L., WATANABE, G., TAYA, K. Effects of Acute Restraint Stress on Sperm Motility and Secretion of Pituitary, Adrenocortical and Gonadal Hormones in Adult Male Rats *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1501–1506, 2010.

RIAD, M., GARCIA, S., WATKINS, K.C., JODOIN, N., DOUCET, E., LANGLOIS, X. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417: 181–94, 2000.

RICCI, L.A., GRIMES, J.M., MELLONI, H.R.Jr. Serotonin type 3 receptors modulate the aggressionstimulating effects of adolescent cocaine exposure in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behav Neurosci* 118: 1097-1110, 2004.

RICCI, L.A., GRIMES, J.M., MELLONI, R.H. JR. Lasting changes in neuronal activation patterns in select forebrain regions of aggressive, adolescent anabolic/androgenic steroid-treated hamsters. *Behavioural Brain Research* 176: 344–352, 2007.

- RILEY, W.T., TREIBER, F.A., WOODS, M.G. Anger and hostility in depression. *J Nerv Ment Dis* 177:668-74, 1989.
- ROBERTS, C., PRICE, G.W., JONES, B.J. The role of 5-HT_{1B/1D} receptors in the modulation of 5-hydroxytryptamine levels in the frontal cortex of the conscious guinea pig. *Eur J Pharmacol* 326: 23-30, 1997.
- ROBERTS, A.C., ROBBINS, T.W., WEISKRANTZ, L. Discussion and conclusions. In: Roberts, A.C., Robbins, T.W., Weiskrantz, L. (Eds.), *The Prefrontal Cortex: Executive and Cognitive Functions*. Oxford University Press, Oxford, pp. 221–242, 1998.
- ROBERTS, C., WATSON, J., PRICE, G.W., MIDDLEMISS, D.N. SB-236057-A: a selective 5-HT_{1B} receptor inverse agonist. *CNS Drug Rev.* 7: 433-44, 2002.
- ROCHA, B.A., SCEARCE-LEVIE, K., LUCAS, J.J., HIROI, N., CASTANON, N., CRABBE, J.C., NESTLER, E.J., HEN, R. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature* 393: 175-178, 1998.
- ROIZEN, J. Epidemiological issues in alcohol-related violence. In: Galanter, M. (Ed.), *Recent Developments in Alcoholism*. Plenum Press, New York, pp. 7-41, 1997.
- ROLLEMA, H., CLARKE, T., SPROUSE, J.S., SCHULZ, D.W. Combined administration of a 5-hydroxytryptamine (5-HT_{1D}) antagonist and 5-HT reuptake inhibitor synergistically increases 5-HT release in guinea pig hypothalamus in vivo. *J Neurochem*, 67: 2204-2207, 1996.
- ROSENBLATT, J.S. Selective retrieving by maternal and nonmaternal female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88: 678–686, 1975.
- ROSENBLATT, J.S., MAYER, A.D., GIORDANO, A.L. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinol* 13: 29-46, 1988.
- ROSENBLATT, J.S., WAGNER, C.K., MORREL, J.I. Hormonal priming and triggering of maternal behavior in the rat with special reference to the relations between estrogen receptor binding and ER mRNA in specific brain regions. *Psychoneuroendocrinology* 19: 543-52, 1994.
- RUDISSAAR, R., PRUUS, K., SKREBUHHOVA, T., ALLIKMETS, L., MATTO, V. Modulatory role of 5-HT₃ receptors in mediation of apomorphine-induced aggressive behaviour in male rats. *Behav Brain Res* 106: 91-96, 1999.
- RUSSEL, J.A., LENG, G. Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol* 157: 343-359, 1998.

SANCHEZ, C., ARNT, J., HYTTEL, J., MOLTZEN, E.K. The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice. *Psychopharmacology* 110: 53-59, 1993.

SANDNABBA, N.K. Selective breeding for isolation-induced intermale aggression in mice: associated responses and environmental influences. *Behav Genet* 26:4 77-488, 1996.

SANTANA, N., BORTOLOZZI, A., SERRATS, J., MENGOD, G., ARTIGAS, F. Expression of serotonin1a and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 100-109, 2004.

SANTELLA, L., CARAFOLI, E. Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB Journal* 11: 1091-1109, 1997.

SARI, Y., MIQUEL, M.C., BRISORGUEIL, M.J., RUIZ, G., DOUCET, E., HAMOM, M. Cellular and subcellular localization of 5-hydroxytryptamine 1B receptors in the rat central nervous system: immunocytochemical, autoradiographic and lesion studies. *Neuroscience* 88: 899-915, 1999.

SARI, Y. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behaviour. *Neurosci Biobehav* Ver 28: 565-582, 2004.

SARHAN, H., CLOEZ-TAYARANI, I., MASSOT, O., FILLION, M.P., FILLION, G. 5-HT1B receptors modulate release of [3H]dopamine from rat striatal synaptosomes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359: 40-47, 1999.

SASSONE-CORSI, P., VISVADER, J., FERLAND, L., MELLON, P., VERMA, I.M. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes and Development* 2: 1529-1538, 1988.

SAUDOU, F., AMARA, D.A., DIERICH, A., LEMEURE, M., RAMBOZ, S., SEGU, L., BUHOT, M.C., HEN, R. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 265: 1875-1878, 1994.

SEGUIN, J.R. Neurocognitive elements of antisocial behavior: relevance of an orbitofrontal cortex account. *Brain Cogn* 55: 185-197, 2004.

SENBA, E., MATSUNAGA, K., TOHYAMA, M., NOGUCHI, K. Stress-induced cfos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res Bull* 31: 329-44, 1993.

SESACK, S.R., DEUTCH, A.Y., ROTH, R.H., BUNNEY, B.S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 290: 213-242, 1989.

SESACK, S.R., PICKEL, V.M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 320: 145–160, 1992.

SHARP, T., BRAMWELL, S.R., GRAHAME-SMITH, D.G. 5-HT₁ agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. *Br J Pharmacol* 96: 283-290, 1989.

SHENG, M., GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-485, 1990.

SHENG, M., MCFADDEN, G., GREENBERG, M.E. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571-582, 1990.

SHORS, T.J., LEUNER, B. Estrogen mediated effects on depression and memory formation in females. *J. Affect. Disord.* 74: 85–96, 2003.

SIH, A., BELL, A., JOHNSON, J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends Ecol Evol* 19: 372–8, 2004.

SIEVER, L.J., BUCHSBAUM, M.S., NEW, A.S., SPIEGEL-COHEN, J., WEI, T., HAZLETT, E.A., SEVIN, E., NUNN, M., MITROPOULOU, V. d,l-fenfluramine response in impulsive personality disorder assessed with [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Neuropsychopharmacology* 20: 413–423, 1999.

SLATTERY, D.A., NEUMANN, I.D. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain *J Physiol* 586: 377–385, 2008.

SLEIGHT, A.J., PEROUTKA, S.J. Identification of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agents using a composite pharmacophore analysis and chemical database screening. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 343: 109-16, 1991.

SMILEY, J.F., GOLDMAN-RAKIC, P.S. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 367: 431–443, 1996.

SMOOTHY, R., BERRY, M.S. Effects of ethanol on behavior of aggressive mice from two different strains: a comparison of simple and complex behavioral assessments. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 645-653, 1983.

SMOTHERMAN, W.P., WIENER, S.G., MENDOZA, S.P., LEVINE, S. Pituitary-adrenal responsiveness of rat mothers to noxious stimuli and stimuli produced by pups. *Ciba Found Symp* 45: 5–25, 1976.

SPINELLA, M. Neurobehavioral correlates of impulsivity: evidence of prefrontal involvement. *Int J Neurosci* 114: 95-104, 2004.

SODERO, A., ORSINGHER, O.A., RAMÍREZ, O.A. Altered serotonergic function of dorsal raphe nucleus in perinatally protein-deprived rats: Effects of fluoxetine administration *European Journal of Pharmacology* 532: 230–235, 2006.

SONNENBERG, J.L., MACGREGOR-LEON, P.F., CURRAN, T., MORGAN, J.I. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 3: 359-365, 1989.

SPERRY, T.S., THOMPSON, C.K., WINGFIELD, J.C. Effects of acute treatment with 8-OH-DPAT and fluoxetine on aggressive behaviour in male song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J Neuroendocrinol* 15: 150-160, 2003.

SPROUSE, J.S., AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* 1:3-9, 1987.

STANFORD, I.M., LACEY, M.G. Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT1B and 5-HT2C receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J. Neurosci.* 16: 7566–7573, 1996.

STEIN, D.J. TOWNEY, J., HOLLANDER, E. The neuropsychiatry of impulsive aggression. In E. Hollander, & D. Stein (Eds.), *Impulsivity and aggression* (pp. 91–105). New York: Wiley, 1995.

STEINBUSCH, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6: 557-618, 1981.

STERN, J.M., LEVINE, S. Pituitary–adrenal activity in the postpartum rat in the absence of suckling stimulation. *Horm Behav* 3: 237–246, 1972.

STERN, J.M., GOLDMAN, L., LEVINE, S. Pituitary–adrenal responsiveness during lactation in rats. *Neuroendocrinology* 12: 179–191, 1973.

STERN, W.C., JOHNSON, A., BRONZINO, J.D., MORGANE, P.J. Neurpharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat. *Neuropharmacology* 20: 979–989, 1981.

STERN, J.M., GALLO, M. Pattern of brain activation of c-fos after maternal aggression in lactating Long-Evans rats, *Soc. Behav. Neuroendo Abstr.* 2: 68, 1998.

STOWERS, L., HOLY, T.E., MEISTER, M., DULAC, C., KOENTGES, G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295: 1493–1500, 2002.

SUMMERS, C.H., SUMMERS, T.R., MOORE, M.C., KORZAN, W.J., WOODLEY, S.K., RONAN, P.J., HOGLUND, E., WATT, M.J., GREENBERG, N. Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience* 116: 553–563, 2003.

SUMMERS, C.H., KORZAN, W.J., LUKKES, J.L., WATT, M.J., FORSTER, G.L., OVERLI, O., HOGLUND, E., LARSON, E.T., RONAN, P.J., MATTER, J.M., SUMMERS, T.R., RENNER, K.J., GREENBERG, N. Does serotonin influence aggression? Comparing regional activity before and during social interaction. *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 679–694, 2005.

SUOMI, L., LINNOILA, M. Low CSF 5-HIAA concentrations and severe aggression and impaired impulse control in nonhuman primates. *Am J Psychiatry* 151: 1485–1491, 1994.

SVARE, B. Maternal aggression: hormonal, genetic, and developmental determinants. In: *Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological and Behavioral Determinants*. NA KRASNEGOR, RS BRIDGES (eds), Oxford UP, New York, pp 118–132, 1990.

SWANN, A.C. Treatment of aggression in patients with bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 60(Suppl 15):25–8, 1999.

SZÉKELY, A.M., BARBACCIA, M.L., COSTA, E. Activation of specific glutamate receptor subtypes increases c-fos proto-oncogene expression in primary cultures of neonatal rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 26: 1779–1782, 1987.

TABER, M.T., DAS, S., FIBIGER, H.C. Cortical regulation of subcortical dopamine release: mediation via the ventral tegmental area. *J. Neurochem.* 65: 1407–1410, 1995.

TAKAHASHI, A., QUADROS, I.M., DE ALMEIDA, R.M.M., MICZEK, M K.A. Brain Serotonin Receptors and Transporters: Initiation vs. Termination of Escalated Aggression *Psychopharmacology*, *submitted*.

TAKAGISHI, M., CHIBA, T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res* 566: 26–39, 1991.

TANAKA, E., NORTH, R.A. Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 69: 1749–1757, 1993.

TEN EYCK, G.R. Serotonin modulates vocalizations and territorial behavior in an amphibian. *Behav Brain Res* 193: 144–147, 2008.

THOMAN, E.B., CONNER, R.L., LEVINE, S. Lactation suppresses adrenal corticosteroid activity and aggressiveness in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 70: 364–369, 1970.

THOMPSON, T., BLOOM, W. Aggressive behavior and extinction-induced response-rate increase. *Psychonomic Sci* 5: 335–336, 1966.

TOMPKINS, E.C., CLEMENTO, A.J., TAYLOR, D.P., PERHACH, J.L.Jr. Tompkins EC, Clemento AJ, Taylor DP, Perhach JL, Jr. Inhibition of aggressive behavior in Rhesus monkeys by buspirone. *Res Commun Psychol Psychiatr Behav* 5: 337-352, 1980.

TILBROOK, A.J., CLARKE, I.J. Neuroendocrine mechanisms of innate states of attenuated responsiveness of the hypothalamo-pituitary adrenal axis to stress. *Front Neuroendocrinol* 27: 285–307, 2006.

TORNER, L., TOSCHI, N., NAVA, G., CLAPP, C., NEUMANN, I.D. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 15: 1381–1389, 2002.

TOUFEXIS, D.J., WALKER, C.D. Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. *Brain Res* 737: 71-77, 1996.

TRAINOR, B.C., FINY, M.S., NELSON, R.J. Paternal aggression in a biparental mouse: Parallels with maternal aggression *Hormones and Behavior* 53: 200–207, 2008.

TREISMAN, R. The serum response element. *TIBS* 17: 423-426, 1992.

TUCKERMANN, J.P., KLEIMAN, A., MCPHERSON, K.G., REICHARDT, H.M. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42: 71–104, 2005.

TUINIER, S., VERHOEVEN, W.M., VAN PRAAG, H.M. Cerebrospinal fluid 5-hydroxyindolacetic acid and aggression: a critical reappraisal of the clinical data. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 10: 147–156, 1995.

UEDA, S., ISHIZUYA-OKA, A., NISHIMURA, A., TAKEUCHI, Y., YOSHIMOTO, K. Aggression and serotonin. *Acta Histochemica et Cytochemica* 32: 31-34, 1999.

UEMURA, Y., KOWALL, N.W., MOSKOWITZ, M.A. Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res* 552: 99–105, 1991.

VALZELLI, L. The “isolation syndrome” in mice. *Psychopharmacology* 31: 305-320, 1973.

VALZELLI, L. Psychopharmacology of aggression: an overview. *Int Pharmacopsychiatry* 16: 39-48, 1981.

VAN DER VEGT, B.J.; LIEUWES, N.; CREMERS, T.I.F.H.; DE BOER, S.F.; KOOLHAAS, J.M. Cerebrospinal fluid monoamine and metabolite concentrations and aggression in rats. *Hormones and Behavior*, 44:199-208, 2003 a.

VAN DER VEGT, B.J., LIEUWES, N., VAN DE WALL, E.H., KATO, K., MOYA-ALBIOL, L., MARTINEZ-SANCHIS, S, et al. Activation of serotonergic neurotransmission during the performance of aggressive behavior in rats. *Behav Neurosci* 117: 667–74, 2003 b.

VAN ERP, A.M.M., MICZEK, K.A. Increased aggression after ethanol self-administration in male resident rats. *Psychopharmacology* 131: 287-295, 1997.

VAN ERP, A.M.M., MICZEK, K.A. Aggressive behavior, increased accumbal dopamine and decreased cortical serotonin in rats. *J Neurosci* 15: 9320-9325, 2000.

VAN OORTMERSEN, G.A., BAKKER, T.C. Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behav Genet* 11: 115–126, 1981.

VAN PRAAG, H.M. Anxiety and increased aggression as pacemakers of depression. *Acta Psychiatr. Scand.*, Suppl. 393: 81–88, 1998.

VARGA, V., SZEKELY, A.D., CSILLAG, A., SHARP, T., HAJOS, M. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* 106: 783–792, 2001.

VEENEMA, A.H., NEUMANN, I.D. Neurobiological Mechanisms of Aggression and Stress Coping: A Comparative Study in Mouse and Rat Selection Lines *Brain Behav Evol* 70: 274–285, 2007.

VEENEMA, A.H., TORNER, L., BLUME, A., BEIDERBECK, D.I., NEUMANN, I.D. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: Link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus *Hormones and Behavior* 51: 11–19, 2007.

VEENEMA, A.H., TORNER, L., BLUME, A., BEIDERBECK, D.I., NEUMANN, I.D. Low inborn anxiety correlates with high intermale aggression: Link to ACTH response and neuronal activation of the hypothalamic paraventricular nucleus *Hormones and Behavior* 51: 11–19, 2007 b.

VEGIOPOULOS, A., HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* 275: 43–61, 2007.

VEIGA, C.P., MICZEK, K.A., LUCION, A.B., DE ALMEIDA, R.M.M. Effect of 5-HT1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. *Braz J Med Biol Res* 40: 825–830, 2007.

VEIGA, C.P., MICZEK, K.A., LUCION, A.B., DE ALMEIDA, R.M.M. Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the dorsal raphé nucleus and prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, *in press*, 2010.

VEIT, R., FLOR, H., ERB, M., HERMANN, C., LOTZE, M., GRODD, W., BIRBAUMER, N. Brain circuits involved in emotional learning in antisocial behavior and social phobia in humans. *Neurosci Lett* 328: 233–6, 2002.

VERGE, D., DAVAL, G., MARCINKIEWICZ, M., PATEY, A., EL MESTIKAWY, S., GOZLAN, H., HAMON, M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J. Neurosci.* 6: 3474–3482, 1986.

VERGNES, M., DEPAULIS, A., BOEHRER, A. Parachlorophenylalanine-induced serotonin depletion increases offensive but not defensive aggression in male rats. *Physiol Behav* 36: 653-658, 1986.

VERTES, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313: 643-68, 1991

VIRKKUNEN, M., DE JONG, J., BARTKO, J., GOODWIN, F.K., LINNOILA, M. Relationship of psychobiological variables to recidivism in violent offenders and impulsive fire setters. A follow-up study. *Arch Gen Psychiatry* 46: 600-603, 1989.

VIRKKUNEN, M., KALLIO, E., RAWLINGS, R., TOKOLA, R., POLAND, R.E., GUIDOTTI, A., NEMEROFF, C., BISSETE, G., KALOGERAS, K., KARONEN, S.L., LINNOILA, M. Personality profiles and state aggressiveness in Finnish alcoholic, violent offenders, fire setters, and healthy volunteers. *Arch Gen Psychiatry* 51: 28-33, 1994.

VOLAVKA, J. *Neurobiology of violence*. American Psychiatric Press, Washington, 1995.

VOLAVKA, J., CROWNER, M., BRIZER, D., CONVIT, A., VAN PRAAG, H., SUCKOW, R.F. Tryptophan treatment of aggressive psychiatric inpatients. *Biol Psychiatry*. 28: 728-32, 1990.

VOLKOW, N.D., TANCREDI, L.R., GRANT, C., GILLESPIE, H., VALENTINE, A., MULLANI, N., WANG, G.J., HOLLISTER, L. Brain glucose metabolism in violent psychiatric patients: A preliminary study. *Psychiatry Research* 61: 243–253, 1995.

WALKER, C.D., LIGHTMAN, S.L., STEELE, M.K., DALLMAN, M.F. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 130: 115-125, 1992.

WALKER, C.D., TROTTIER, G., ROCHFORD, J., LAVALLÉE, D. Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. *J. Neuroendocrinol.* 7: 615-622, 1995.

WALKER, C.D., TOUFEXIS, D.J., BURLET, A. Hypothalamic and limbic expression of CRF and vasopressin during lactation: implications for the control of ACTH secretion and stress hyporesponsiveness. *Prog. Brain Res.* 133: 99–110, 2001.

WANG, S., ZHANG, Q.J., LIU, J., WU, Z.H., WANG, T., GUI, Z.H., CHEN, L., WANG, Y. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal firing of the midbrain raphe nuclei 5-HT neurons and a decrease of their response to 5-HT_{1A} receptor stimulation in the rat. *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.12.051, 2009.

WATTS, A.G., TANIMURA, S., SANCHEZ-WATTS, G. Corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin gene transcription in the hypothalamic paraventricular nucleus of unstressed rats: daily rhythms and their interactions with corticosterone. *Endocrinology* 145: 529–540, 2004.

WESTERGAARD, G.C., CHAVANNE, T.J., LUSSIER, I.D., HOUSER, L., CLEVELAND, A., SUOMI, S.J., HIGLEY, J.D. Left-handedness is correlated with CSF monoamine metabolite and plasma cortisol concentrations, and with impaired sociality, in free-ranging adult male rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Laterality* 8: 169-87, 2003.

WINDLE, J.R., BRADY, M.M., KUNANANDAM, T., DA COSTA, A.P.C., WILSON, B.C., HARBUZ, M., LIGHTMAN, S.L., INGRAM, C.D. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to α 1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 138: 2829-2834, 1997.

WILKINSON, L.O., DOURISH, C.T. Serotonin and animal behavior, in: S. Peroutka (Ed.) *Serotonin Receptor Subtypes, Basic and Clinical Aspects*, Wiley, New York, pp. 147-210, 1991.

WINBERG, S., NILSSON, G.E., OLSEN, K.H. Changes in brain serotonergic activity during hierarchic behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) are socially induced. *J Comp Physiol A* 170: 93–9, 1992.

WOGAR, M.A., BRADSSHAW, C.M., SZABADI, E. Effects of lesions of the ascending 5-hydroxytryptaminergic pathways on choice between delayed reinforcers. *Psychopharmacology* 111: 239-243, 1993.

WOTJAK, C.T., KUBOTA, M., LIEBSCH, G., MONTKOWSKI, A., HOLSBOER, F., NEUMANN, I., LANDGRAF, R. Release of Vasopressin within the Rat Paraventricular Nucleus in Response to Emotional Stress: A Novel Mechanism of Regulating Adrenocorticotrophic Hormone Secretion? *The Journal of Neuroscience*, 16: 7725–7732, 1996.

YAMASAKI, H., LABAR, K.S., MCCARTHY, G. Dissociable prefrontal brain systems for attention and emotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 11447–11451, 2002.

YODYINGYUAD, U., DE LA RIVA, C., ABBOTT, D.H., HERBERT, J., KEVERNE, E.B. Relationship between dominance hierarchy, cerebrospinal fluid levels of amine transmitter metabolites (5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid) and plasma cortisol in monkeys. *Neuroscience* 16: 851-858, 1985.

ZAYAN, R. The specificity of social stress. *Behav Processes* 25: 81–93, 1991.