

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA E EXPLORATÓRIA DE CAMUNDONGOS QUE APRESENTAM COMPORTAMENTO AGRESSIVO EM AMBIENTE LABORATORIAL

Gabriel Melo de Oliveira¹

RESUMO

O estudo do comportamento de animais de laboratório tem por objetivo promover o bem estar e minimizar o seu desconforto durante os ensaios científicos, possibilitando entender as interações sociais e desenvolver métodos de enriquecimento ambiental, aumentando assim a qualidade de vida dos animais mantidos em laboratório. O objetivo deste estudo é avaliar a atividade motora e exploratória de camundongos machos adultos, com padrão de comportamento agressivo (PCA), mantidos em biotérios de experimentação e sua implicância na qualidade de vida. Durante a rotina de manutenção dos animais, observou-se a presença de padrões de comportamento em diversos agrupamentos de camundongos machos adultos. Foram utilizados dois métodos etológicos para avaliação: i) teste do campo aberto e ii) teste do labirinto em cruz elevado. Os animais foram divididos em três categorias de comportamentos: dominantes, subordinados e solitários. Os resultados mostraram que nos grupos em que houve a presença de padrões de comportamento agressivo, em ambos os testes etológicos, houve redução na atividade motora e exploratória nas categorias dominantes e submissos. Os camundongos submissos e solitários demonstraram uma diminuição significativa em ambos os tipos de atividade, compatível com o comportamento depressivo descrito na literatura em modelos experimentais. Os resultados sugerem que a presença de PCA compromete a qualidade de vida de todos os componentes do grupo de camundongos, sendo mais grave nos animais que sofrem as agressões (subordinados). Certificado CEUA nº 20/08 /FIOCRUZ.

Palavras-chave: Camundongos. Atividade Motora. Animais de Laboratório. Comportamento Animal.

1 Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro

Autor para correspondência:
Gabriel Melo de Oliveira
E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação: 25/06/2011
Aceito para publicação: 28/11/2011

1 INTRODUÇÃO

Há uma intensa discussão relacionada ao bem estar dos animais utilizados em ensaios biomédicos, bem como várias questões a respeito da relevância do uso de animais e a forma como são manipulados durante a investigação científica. Os princípios éticos no uso de animais de laboratório têm sido guiados pelo princípio da 3Rs¹. Resumidamente, esses princípios estão baseados na

substituição de animais por métodos alternativos, na redução do número de animais utilizados e no refinamento das técnicas de alojamento e manipulação. No modelo de primatas não humanos, vários estudos abordam a busca e elaboração de um ambiente capaz de propiciar aos indivíduos o desenvolvimento de sua atividade exploratória e aumentar a qualidade da interação social^{2,3}. Em relação aos roedores também existem vários estudos relacionados ao bem-estar^{4,5}. No entanto, em levantamento de artigos indexados (Pub Med

- Junho de 2011), um número relativamente pequeno de manuscritos estão relacionados ao comportamento individual e social de camundongos. Aproximadamente 135.694 estudos avaliaram a questão do bem-estar em primatas não humanos, enquanto que apenas 372 trabalhos estão relacionados a esse tema em camundongos⁶. Essas reduzidas referências sobre o assunto motivou-nos a realizar o estudo do comportamento social e individual de camundongos em biotérios de experimentação. Além disso, acreditamos que esse conhecimento também seja importante para melhorar a empatia do manipulador em relação ao animal, aumentando a consciência da ética nos procedimentos realizados e minimizando a ocorrência de acidentes biológicos⁶.

O ato de hierarquizar promove o domínio e a subordinação entre os membros dos agrupamentos e podem ser observados em camundongos machos ou fêmeas. No caso do agrupamento de camundongos machos adultos, há alta prevalência de agressão entre os indivíduos. O surgimento dessas agressões pode ser facilmente observado durante a rotina de limpeza e tratamento desses animais⁷. A agressão entre os camundongos machos pode ter várias causas: genéticas⁸, hormonais^{9,10} ou neuroquímicas^{11,12} entre outras. Sugeriu-se que esse tipo de agressão esteja relacionado com a disputa dos indivíduos para a dominação social dentro do esquema de hierarquização¹³. Entretanto, os resultados de outros estudos indicaram que a agressão ocorreu por dificuldade de um elemento do grupo se impor ou manter a hierarquia¹⁴; com a presença de indivíduos dominantes e subordinados, puderam identificar os camundongos que promoveram a agressão e os que a sofreram¹⁵, estando estes em uma posição inferior na organização social¹⁶.

Por acreditarmos que a presença de PCA compromete o bem-estar dos camundongos e pode ser observada pelo seu comportamento alterado, interferindo nas posições hierárquicas, realizamos este estudo com o objetivo de avaliar a atividade motora e exploratória em camundongos machos adultos que demonstravam um padrão de comportamento agressivo (PCA) em seu agrupamento,

usando métodos etológicos, normalmente utilizados para a avaliação de modelos de depressão e ansiedade¹⁶; medimos a intensidade dos animais dominantes, subordinados e também em isolamento social¹⁷.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Ressaltamos que este estudo foi realizado através da observação do surgimento espontâneo de agressão; em nenhum momento a agressividade foi induzida. Realizamos também uma comparação de atividade entre os grupos de animais que não apresentavam PCA. Os camundongos mantidos na ausência de interação social, descritas na literatura como um modelo de hipoatividade ou comportamento depressivo, foram utilizados como referência de comportamento alterado (controle negativo)^{18,19}.

2.1 Animais

Os camundongos foram albergados no Setor de Experimentação Animal no Laboratório de Biologia Celular / IOC sob condições ambientais e sanitárias em conformidade com o “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório” (Publicação nº DHEW [NIH] 80-23, revista em 1985). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas com ciclos de fotoperíodos claro/escuro de 12 horas, umidade relativa fixada em 45 a 55%, temperatura de 22°C e troca de ar de 25 trocas por hora. O fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. Os animais foram agrupados de acordo com os protocolos definidos pelos pesquisadores. Realizamos a higienização duas vezes por semana, sempre nos mesmos horários. Foram observados um número total de aproximadamente 146 gaiolas com 6 animais (número médio) cada. Todos os camundongos eram da linhagem Swiss Webster, machos e adultos (mais de dez semanas de vida), provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL-Fiocruz). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com

princípios internacionais de ética e bem-estar, com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ), nº 20/08.

2.2 Padrão de comportamento agressivo (PCA)

Avaliamos em nossa rotina diária, principalmente durante as higienizações, o aparecimento de sinais de agressão, brigas, mordidas e/ou dominância em cada grupo de camundongos. Observamos, também, sinais de estresse, tais como vocalizações, perda de peso e outros. Dessa maneira buscamos identificar e categorizar os grupos e os indivíduos que apresentaram PCA. Somente os agrupamentos que o apresentaram, com exceção do controle sem agressão (*norm*), foram avaliados nos respectivos testes após sua categorização. Nossa prevalência de PCA foi de 60% então foram avaliados nos testes, aproximadamente, 87.6 gaiolas com um total de 525.6 animais.

2.3 Esquematização das categorias

Dividimos os camundongos em quatro categorias: i) Normal (*norm*), em que nenhum dos indivíduos tinha PCA no agrupamento. ii) Dominante (*dnte*), caracterizada por indivíduos em grupos com presença de PCA, que não apresentaram ferimentos. iii) **Subordinada** (*subd*), em relação aos animais que tinham mordidas e ferimentos em grupos com PCA. iv) Solitário (*solit*), os camundongos que foram mantidos em isolamento social.

2.4 Teste do campo aberto

Este teste consiste na medição de variáveis comportamentais em modelos experimentais, na avaliação de situações de ansiedade e depressão. Os animais são colocados em uma arena limitada a 16 espaços de tamanhos iguais²⁰. A avaliação comportamental foi realizada através da atividade motora pela medição do número de quadrantes atravessados (deslocamento horizontal) em um período de cinco minutos, enquanto que a atividade exploratória foi medida através do número de deslocamentos verticais (*rearing*), independen-

temente da localização na arena, também em um período de cinco minutos. Este teste foi realizado em uma sala separada, sempre no mesmo horário (entre 9 e 12 horas) apenas por um único manipulador.

2.5 Teste do labirinto em cruz elevada

Este método foi utilizado para avaliar a habilidade motora e de interesse exploratório de cada animal²¹. A avaliação do interesse exploratório e da capacidade locomotora foi realizada através da medição do número de entradas e tempo gasto pelos camundongos nos braços fechados e abertos ao longo do período de cinco minutos. Este teste foi realizado em uma sala separada, sempre no mesmo horário (entre 13 e 17 horas) apenas por um único manipulador.

2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão (\pm SD). A significância entre as médias foi determinada através do teste *T Student* e os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

A observação dos animais albergados em nossa rotina possibilitou a divisão em categorias de acordo com o PCA. Os tipos de comportamento são esquematizados na figura 1. A primeira categoria descrita é de camundongos que não demonstram comportamento agressivo do grupo, denominado de normal (Figura 1A). Em relação ao PCA, distinguimos os agrupamentos em duas categorias de comportamento individual, os agressores (dominantes) e subordinados (agredidos). Estas categorias foram o nosso objeto de estudo e fizeram parte de agrupamentos que denominamos como “um contra todos” quando um indivíduo agrediu todos os outros componentes (Figura 1B) e “todos contra um”, quando vários componentes

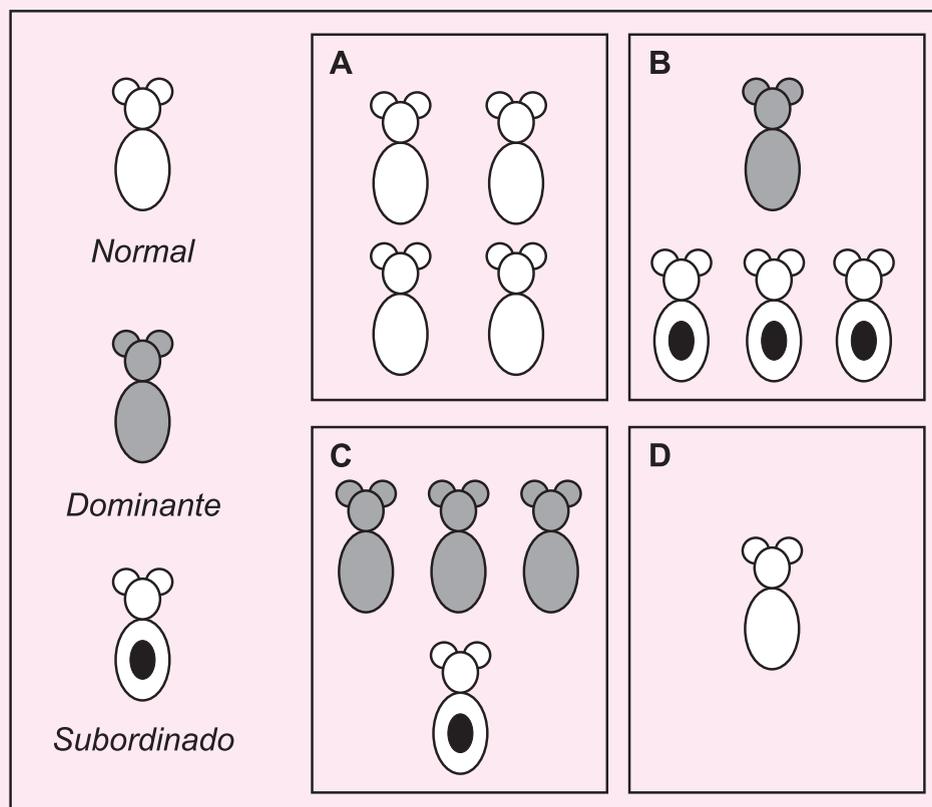


Figura 1 - Esquematisação do comportamento observado em camundongos machos em ambiente laboratorial: camundongos sem alteração de comportamento (branco n=315), dominantes (cinza n=52) e subordinados (com mancha preta n=157). Animais em agrupamentos sem a presença de comportamentos agressivos (A). Grupos de animais com a presença do PCA foram divididos em duas categorias: “um contra todos” (B), em que há um animal dominante e “todos contra um” (C), em que há apenas um subordinado. Atividade de animais alojados em isolamento social (D)

agrediram apenas um indivíduo do grupo (Figura 1 C). Além disso, também avaliamos a atividade dos camundongos que foram alojados em isolamento social (Figura 1D).

Os resultados do teste de campo aberto (Figura 2) demonstraram que os camundongos dominantes e subordinados apresentaram uma diminuição significativa da atividade motora (Figura 2A) e exploratória (Figura 2B), quando comparados aos camundongos normais. Animais subordinados tinham menor atividade em comparação aos dominantes e semelhante aos animais em isolamento social (Figura 2A-B), tanto em termos de deslocamentos horizontal como em vertical. Na avaliação da atividade por categoria, os dominantes apresentaram maior atividade, compatível com o perfil “todos contra um” (Figura 3).

O teste do labirinto em cruz elevado (Figura 4) apresentou resultados semelhantes com os dados obtidos através do teste anterior. Animais dominantes e subordinados apresentaram diminuição da atividade motora, medido pelo número de entradas e o tempo de presença nos braços abertos ou fechados, quando comparados aos animais normais (Figura 4A-B). Além disso, os animais subordinados demonstraram uma diminuição do número de entradas nos braços abertos quando comparado com os normais e os dominantes (Figura 4A). Quanto à atividade exploratória, o tempo restante nos braços fechados foi maior para os camundongos subordinados. Esses valores, em número de visitas ou o tempo de permanência nos braços foram semelhantes para os subordinados e solitários (Figura 4B).

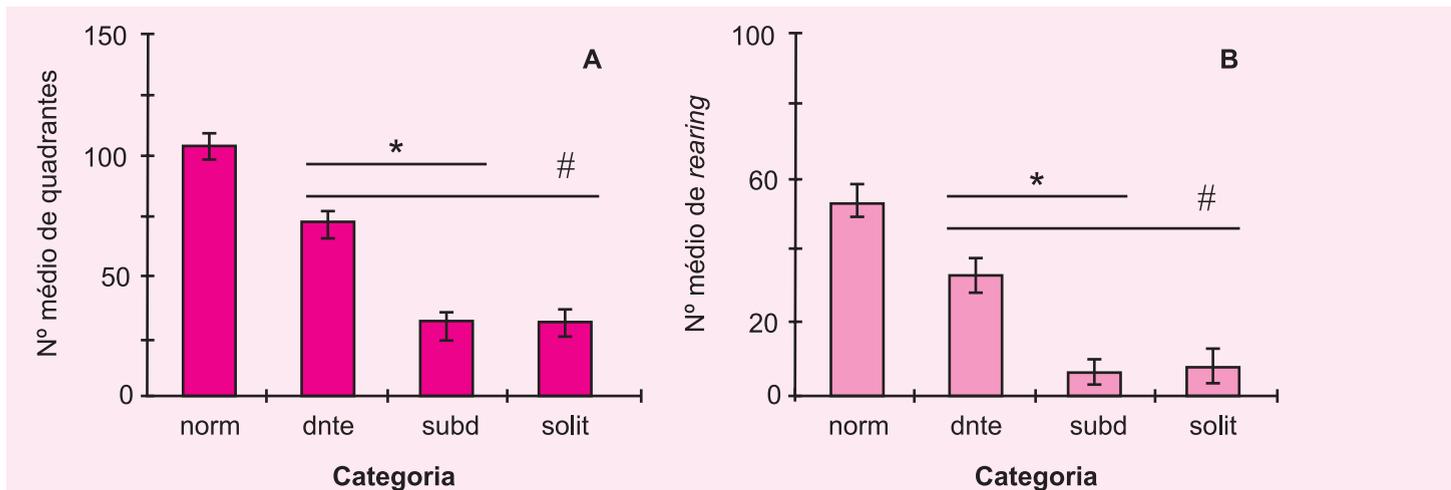


Figura 2 - Avaliação das atividades motora e exploratória através de teste do campo aberto: Nas categorias normais (*norm*), dominantes (*dnste*), subordinados (*subd*) e solitários (*solit*) medimos a atividade motora (A) e exploratória (B). O (#) indica uma diferença significativa dos normais em relação aos dominantes, subordinados e solitários ($p < 0,05$). O asterisco indica diferença estatística dos dominantes em relação aos subordinados ($p < 0,05$).

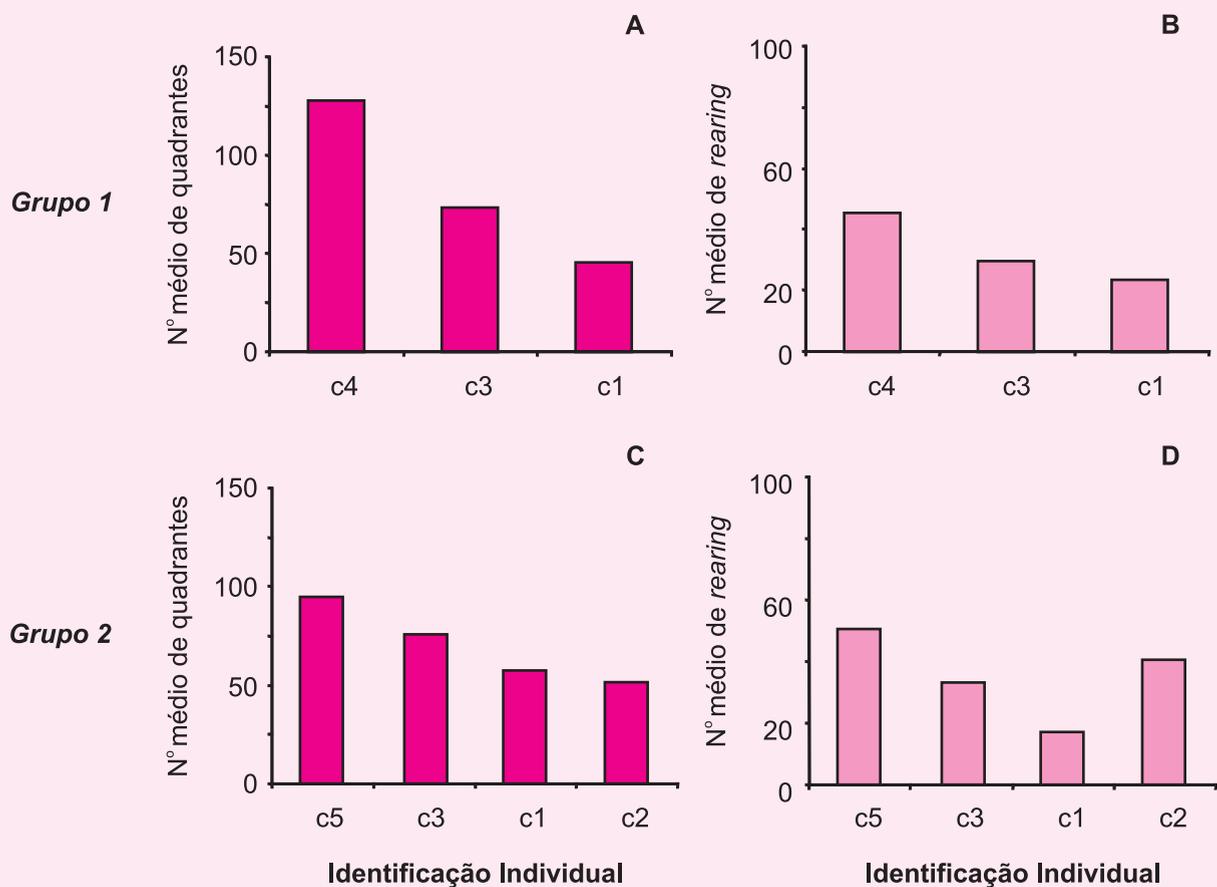


Figura 3 - Teste do campo aberto na categoria dominante do agrupamento "todos contra um": No primeiro grupo, observamos três camundongos dominantes (c1, c3 e c4). No segundo grupo, identificamos a presença de quatro indivíduos dominantes (c1, c2, c3 e c5). Mensuramos a atividade motora (A e C) e a atividade exploratória (B e D) de todos os animais e indicamos com um asterisco a diferença estatística entre os indivíduos dominantes de um mesmo grupo ($p < 0,05$).

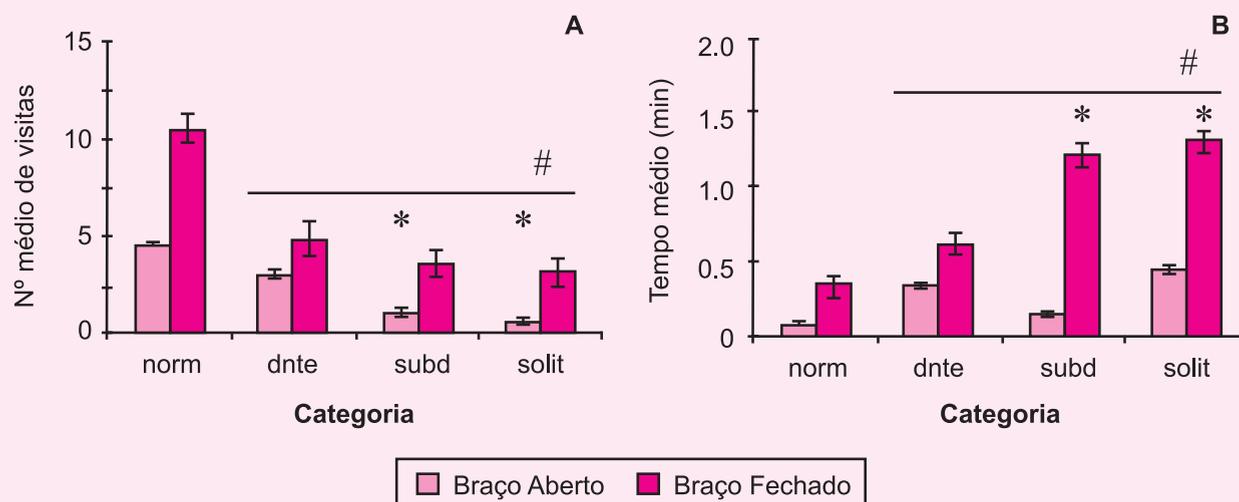


Figura 4 - Uso do teste de Labirinto em cruz elevada nos agrupamentos: Nas diversas categorias, avaliamos o número médio da presença do camundongo nos braços abertos e no interior dos braços fechados (A). Mensuramos também o tempo médio de permanência de cada categoria nos braços abertos e fechados (B). O # indica diferença estatística entre os normais e os dominantes, subordinados e solitários ($p < 0,05$). O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao número médio de visitas no braço aberto de camundongos subordinados e solitários quando comparados aos normais e dominantes ($p < 0,05$)

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, indicando que os grupos de camundongos machos na idade adulta podem apresentar PCA⁷. O comportamento agressivo pode ter várias causas. A influência genética pode estar relacionada aos segmentos de cromossomos, com efeitos sobre o comportamento agressivo²². Essa abordagem é ilustrada pelo efeito da parte macho-específica do cromossomo Y. Propõe-se que um candidato da posição para esse efeito é o Sry^{22,8}. A testosterona também aumenta a expressão do hormônio corticoide adrenal (ADH) em níveis na amígdala medial, no hipotálamo lateral e área pré-ótica medial, que estão envolvidos no comportamento agressivo¹⁰. A expressão de neurotransmissores também está relacionada ao comportamento agressivo, como a serotonina e seus mediadores²³. Acreditamos que a presença de comportamento agressivo e a dominância social em camundongos machos adultos podem ser o resultado desses fatores em conjunto. Esses mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos.

Este trabalho foi motivado pela seguinte indagação: “Por que o PCA é observado em alguns grupos e não em outros em um mesmo lote de fornecimento de animais e sob as mesmas condições ambientais?” Questões como competição sexual²⁴ e inclusão de intrusos²⁵ comumente descritos na literatura não estão relacionados a nossa rotina. Vários estudos têm descrito dominância social em camundongos machos e relacionada à descrição de categorias como dominante e submisso^{26,27}. Contudo não pudemos determinar, a partir desses resultados, a causa do surgimento de PCA nos agrupamentos. Nem esse é o objetivo deste trabalho, porém pudemos observar que o surgimento de PCA interferiu em parâmetros comumente utilizados para avaliar o bem-estar dos animais, como a atividade motora e exploratória^{20,21}.

Neste estudo, identificamos um perfil interessante de comportamento: a relação de apenas um indivíduo exercendo sua dominação através da agressão em todos os outros indivíduos, no qual denominamos *um contra todos* e quando todos agridem apenas um indivíduo, no qual não conseguimos identificar o tipo de dominação e denominamos como *todos contra um*. Hilakivi et

al.²⁸ relatam perfil similar ao observado por nós, principalmente quando relacionado à dominação de um indivíduo agredindo todos os outros^{28,29}.

Utilizando métodos etológicos, normalmente usados para a avaliação de modelos de depressão e ansiedade¹⁶, medimos o nível de atividade motora e exploratória em animais dominantes, subordinados e também em isolamento social¹⁷, independentemente se esses indivíduos participam de agrupamentos *um contra todos* ou *todos contra um*.

A atividade motora e o interesse exploratório dos camundongos surgem da exigência de informações relacionadas a um novo ambiente. Esse comportamento pode ser avaliado através de testes em campo aberto e labirinto em cruz elevado. Os resultados para os dois testes foram semelhantes. Nossos resultados demonstraram que os dominantes e subordinados apresentaram diminuição das atividades motoras e exploratórias em relação aos agrupamentos sem PCA. Essa diminuição da atividade está relacionada ao estresse crônico causado pelo comportamento agressivo dos animais³⁰. Além disso, os animais subordinados apresentaram menor atividade em comparação com os dominantes, e semelhante aos animais em isolamento social. O alojamento individual de camundongos está relacionado a um modelo experimental de privação social e a desconforto e estresse³¹. Isso pode causar as alterações fi-

siológicas e comportamentais conhecidas como síndrome de isolamento³². A depressão clínica e o entendimento desta patologia foi avaliada através de testes comportamentais como o teste do campo aberto e do labirinto em cruz elevada. Além disso, o modelo de isolamento social foi utilizado por apresentar reduzida atividade motora e exploratória^{33,34}.

Dessa maneira, nossos resultados sugeriram que a intensidade de atividade motora e exploratória ocorreu após o processo de organização social e de dominação. A presença de PCA nos agrupamentos comprometeu o bem-estar dos indivíduos. Isso fica evidente pela significativa diminuição da atividade motora e do interesse exploratório dos camundongos em agrupamentos com PCA em comparação com a atividade dos indivíduos dos agrupamentos harmônicos (normal). Apesar de o agressor (dominante) e agredido (subordinado) estarem sofrendo de estresse crônico, este desconforto foi mais grave nos camundongos subordinados que sofrem permanentemente as agressões, inferido da observação da intensidade inferior de atividade motora e exploratória para essas respectivas categorias, semelhante aos resultados dos testes comportamentais encontrados para camundongos em isolamento social e que, por sua vez, está relacionado a modelos experimentais de depressão.

ASSESSMENT OF MOTOR AND EXPLORATORY ACTIVITY OF MICE THAT EXHIBIT AGGRESSIVE BEHAVIOR IN THE LABORATORY

ABSTRACT

The study of the behavior of laboratory animals is to promote the welfare and minimize discomfort during the same scientific trials, allowing to understand social interactions and develop methods of environmental enrichment, thereby increasing the quality of life of animals kept in the laboratory. The aim of this study was to evaluate the motor activity and exploratory adult male mice with a pattern of aggressive behavior (PCA), kept in experimentation and his welfare. During routine maintenance of the animals showed the presence of behavioral patterns in different groups of adult male mice. Two ethological methods were used to assess: i) open-field test and ii) test the elevated plus maze. The

animals were divided into three behavioral categories: dominant, subordinate and solitary. The results showed that in groups where there was the presence of aggressive behavior patterns in both ethological tests, a reduction in motor activity and exploratory categories in dominant and submissive. The lonely and submissive mice showed a significant decrease in both types of activity, consistent with the depressive behavior described in the literature in experimental models. The results suggest that the presence of PCA compromises the quality of life of all components of the group of mice was more severe in animals suffering aggressions (subordinates). Certified CEUA No. 20/08 / FIOCRUZ.

Keywords: Mice. Motor Activity. Animals, Laboratory. Behavior, Animal.

ABSTRACT

REFERÊNCIAS

1. Russel W, Burch R. The principles of humane experimental technique. England: Universities Federation for Animal Welfare; 1992. 238 p.
2. Nevalainen T, Kemppinen N, Meller A. Refinement alternative for animal housing - enrichment. ALTEX. 2006; 23:Suppl:93-5.
3. Baker K. Enrichment and primate centers: closing the gap between research and practice. J Appl Anim Welf Sci. 2007;10(1):49-54.
4. Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". Lab Anim. 2002 Jul;36(3):243-70.
5. Gonder JC, Laber K. A renewed look at laboratory rodent housing and management. ILAR J. 2007;48(1): 29-36.
6. Oliveira G, Santana R, Batista W, Soeiro M. Bem estar de camundongos utilizados em laboratório de pesquisa – avaliação do comportamento individual e social. 2º Congresso Internacional de Conceitos em Bem-Estar; 9-11 ago. 2007; Rio de Janeiro, BR. WSPA; 2007.
7. Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans B. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. Lab Anim. 2003 Oct;37(4):300-13.
8. Gatewood JD, Wills A, Shetty S, Xu J, Arnold AP, Burgoyne PS, et al. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. J Neurosci. 2006 Feb;26(8): 2335-42.
9. Kudryavtseva NN, Amstislavskaya TG, Kucheryavy S. Effects of repeated aggressive encounters on approach to a female and plasma testosterone in male mice. Horm Behav. 2004 Feb;45(2):103-7.
10. Giammanco M, Tabacchi G, Giammanco S, Di Majo D, La Guardia M. Testosterone and aggressiveness. Med Sci Monit. 2005 Apr;11(4):RA136-45. Epub 2005 Mar 24.
11. Guillot PV, Chapouthier G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains. Behav Brain Res. 1996 May;77(1-2):211-3.
12. Nelson RJ, Trainor BC, Chiavegatto S, Demas GE. Pleiotropic contributions of nitric oxide to aggressive behavior. Neurosci Biobehav Rev. 2006;30(3): 346-55. Epub 2005 Apr 18.
13. DiRocco DP, Xia Z. Alpha males win again. Nat Neurosci. 2007 Aug;10(8):938-40.
14. Bragin AV, Osadchuk LV, Osadchuk AV. The experimental model of establishment and maintenance of social hierarchy in laboratory mice. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 2006 May-Jun;56(3):412-9.
15. Lalonde R, Strazielle C. Relations between open-field, elevated plus-maze, and emergence tests as displayed by C57/BL6J and BALB/c mice. J Neurosci Meth. 2008 Jun 15; 171(1):48-52. Epub 2008 Feb 12.
16. Liu GX, Cai GQ, Cai YQ, Sheng ZJ, Jiang J, Mei Z, et al. Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. Neuropsychopharmacology. 2007 Jul;32(7):1531-9. Epub 2006 Dec 13.
17. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. Behav Brain Res. 2004 Dec;155(2):197-206.
18. Kalueff AV, Jensen CL, Murphy DL. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. Brain Res. 2007 Sep 12;1169:87-97. Epub 2007 Jul 14.
19. Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? Neurosci Biobehav Rev. 2001 May;25(3):219-33.
20. Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In Eisenk HJ. Experiments in Personality. London: Routledge and Kegan Paul; 1960. p. 31-71.
21. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-

- maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67.
22. Maxson SC. Searching for candidate genes with effects on an agonistic behavior, offense, in mice. *Behav Genet*. 1996 Sep;26(5):471-6.
23. Chiavegatto S, Nelson RJ. Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Horm Behav*. 2003 Sep;44(3):233-41.
24. Simpson ER, Davis SR. Another role highlighted for estrogens in the male: sexual behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19; 97(26):14038-40.
25. Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. The critical role of familiar urine odor in diminishing territorial aggression toward a castrated intruder in mice. *Physiol Behav*. 2007 Feb 28; 90(2-3):512-7. Epub 2006 Dec 5.
26. Avitsur R, Kinsey SG, Bidor K, Bailey MT, Padgett DA, Sheridan JF. Subordinate social status modulates the vulnerability to the immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2007 Sep-Nov;32(8-10):1097-105. Epub 2007 Oct 22.
27. Dubrovina NI. Effects of activation of D1 dopamine receptors on extinction of a conditioned passive avoidance reflex and amnesia in aggressive and submissive mice. *Neurosci Behav Physiol*. 2006 Jul;36(6):679-84.
28. Hilakivi LA, Lister RG, Durcan MJ, Ota M, Eskey R, Mefford I, et al. Behavioral, hormonal and neurochemical characteristics of aggressive alpha mice. *Brain Res*. 1989 Nov 13;502(1):158-66.
29. Hilakivi LA, Ota M, Lister, RG. Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral 'despair'. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989 Jun;33(1):371-4.
30. Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Panerai AE, Sgoifo A, Dantzer R, Parmigiani S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005 Feb;29(1):67-81. Epub 2004 Dec 9.
31. Brain P. What does individual housing mean to a mouse? *Life Sci*. 1975 Jan 15;16(2):187-200.
32. Hol T, Van den Berg CL, Van Ree JM, Spruijt BM. Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in the rat. *Behav Brain Res*. 1999 Apr;100(1-2):91-7.
33. Malatynska E, Rapp R, Harrawood D, Tunnicliff G. Submissive behavior in mice as a test for antidepressant drug activity. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Oct;82(2):306-13. Epub 2005 Sep 26.
34. Tunnicliff G, Malatynska E. Central GABAergic systems and depressive illness. *Neurochem Res*. 2003 Jun;28(6):965-76.