

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROPOSTA DE VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE  
AGRESSIVIDADE COM *Gallus gallus***

**Osvaldo Silva Barbosa**

Médico Veterinário

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROPOSTA DE VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE  
AGRESSIVIDADE COM *GALLUS GALLUS***

**Osvaldo Silva Barbosa**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe de Souza Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

**2014**

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da  
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB*

B238p *Barbosa, Osvaldo Silva.*

*Proposta de validação de um modelo de agressividade com Gallus  
Gallus / Osvaldo Silva Barbosa. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2014.*

28 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.  
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2014.

Bibliografia.

Orientador (a): Luís Felipe de Souza Silva.

1. Galos de combate 2. Comportamento animal 3. Galos – comportamento  
agressivo I. Silva, Luís Felipe de Souza Silva (Orientador) II. Título.

*UFPB/BSAR*

*CDU: 636.588(043.3)*

## **FICHA DE AVALIAÇÃO**

Nome : BARBOSA, Osvaldo Silva

Título: Proposta de Validação de um Modelo de Agressividade com *Gallus Gallus*

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal da Paraíba-  
UFPB, como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal

**DATA:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Luis Felipe de Sousa Silva**

**Orientador**

---

---

**Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra**

**Primeiro Membro**

---

---

**Profa. Dra. Maricelma Ribeiro Moraes**

**Segundo Membro**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Nascido em 20 de julho de 1978, no município de Jequié, Estado da Bahia. Ingressou no curso de Medicina Veterinária do Centro de Ciências e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR/UFCG), Campus II, em março de 2000. Obteve o Título de Médico Veterinário em dezembro de 2004. Trabalhou na Secretaria de Agricultura do Estado da Paraíba, exercendo a função de fiscal agropecuário e chefe de Unidade Local de Sanidade Animal, quando ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte da execução deste trabalho.

Primeiramente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela honra de compor a turma pioneira do mestrado deste Programa.

Ao meu orientador Luís Felipe, pela amizade que construímos neste período, pela compreensão, paciência e ensinamentos, como também, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Aos alunos de graduação Johann, Vinícius, Warlen e Anderson, por sua colaboração e amizade e sem os quais o trabalho não seria possível.

Ao Coordenador do PPGCAn, Prof. Ricardo Guerra por sua paciência, colaboração e ensinamentos.

A professora Maricelma Ribeiro pela grande contribuição para o enriquecimento deste trabalho.

A professora Rosângela, a minha primeira orientadora na graduação.

Ao técnico do laboratório de Fisiologia, Antônio, pela colaboração e presteza.

Aos meus colegas de turma: Max, Tercio e Iácome, com quem criei uma grande amizade.

Aos meus pais Sebastião e Maria do Socorro (*in memorian*). Como também, aos meus irmãos Luciano, Lincoln, Antônia Sandra, Maria Aparecida e Macário.

À minha esposa Sandra e minha querida filha Maria Eduarda, um presente de Deus em minha vida.

A todos que fazem o Centro de Ciências Agrárias pela estrutura, apoio e contribuições para o desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMO GERAL.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
Capítulo 1 – Proposta de validação de um modelo de agressividade com <i>Gallus gallus</i> .....	05
ABSTRACT.....	06
RESUMO.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
MATERIAL E METODOS.....	09
Animais.....	09
Drogas.....	10
Flutamida.....	10
Finasterida.....	10

Anastrazol.....	10
Teste Comportamental.....	11
Análise Comportamental.....	11
Análise dos Resultados.....	12
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	16
LEGENDA DAS FIGURAS.....	20
CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo1</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b> Número médio ± EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por <i>Gallus gallus</i> do grupo controle, contra o rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. .... 21	
<b>Figura 2.</b> Número médio ± EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por <i>Gallus gallus</i> do grupo tratado com flutamida, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. * $p < 0,05$ quando comparado com a L.B....	21
<b>Figura 3.</b> Número médio ± EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por <i>Gallus gallus</i> do grupo tratado com inasterida, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. * $p < 0,05$ quando comparado com a L.B....	21
<b>Figura 4.</b> Número médio ± EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por <i>Gallus gallus</i> do grupo tratado com anastrozol, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. * $p < 0,05$ quando comparado com a L.B.....	22

# **PROPOSTA DE VALIDAÇÃO DE UM MODELO DE AGRESSIVIDADE COM *Gallus gallus***

**RESUMO GERAL** - O objetivo do presente trabalho foi apresentar uma proposta para validar um novo modelo de estudo de agressividade utilizando *Gallus gallus* através da avaliação das respostas agressivas após a inibição da ação da testosterona ou da sua conversão em di-hidrotestosterona ou estradiol. Para tanto, foram usados 48 galos (*Gallus gallus*) os quais foram divididos em duplas. Durante o experimento os animais foram tratados diariamente com flutamida (antiandrógeno), finasterida (inibidor da 5 alfa-redutase) ou Anastrozol (inibidor da aromatase), por 21 dias e testados por 28 dias para o comportamento agressivo a cada 7 dias. Durante o teste comportamental os animais foram colocados no interior de uma arena (2,0 m<sup>2</sup>) com um cilindro de material plástico translucido (0,4 m de raio) no seu interior. Um dos animais foi colocado no cilindro, enquanto que, o animal que seria testado ficava livre na arena. Os testes comportamentais tiveram duração de 5 minutos, as interações comportamentais foram filmadas e o número de saltos e bicadas direcionadas ao animal que se encontrava no interior do cilindro foram contabilizados. Os animais foram divididos em quatro grupos (controle, flutamida, finasterida e anastrozol) de acordo com seus tratamentos. Nossos resultados mostram que o tratamento com flutamida, finasterida ou anastrozol foram capazes de reduzir as respostas agressivas de saltos em *Gallus gallus*. Além disso, o tratamento com anastrozol reduziu o número de bicadas aos 28 dias de experimento. Uma vez que as respostas agressivas de salto foram reduzidas após a inibição da ação da testosterona ou da sua conversão em diidrotestosterona ou estradiol, podemos concluir que o modelo de agressividade com *Gallus gallus* pode ser utilizado para estudo de respostas comportamentais agressivas.

Palavras-chave: Comportamento agressivo, Estradiol, Galos, Testosterona.

# **PROPOSER TO VALIDATE A NEW STUDY MODEL FOR AGGRESSION WHIT *Gallus gallus***

## **ABSTRACT**

The objective of the current study was proposer to validate to a new study model for aggression using *Gallus gallus* by evaluating their aggressive responses after inhibition of the testosterone action or its conversion to dihydrotestosterone or estradiol. For this, we used 48 roosters (*Gallus gallus*) divided in pairs. During the experiment the animals were treated daily with flutamide (antiandrogen), finasteride (inhibitor of 5 alpha-reductase) or anastrozole (aromatase inhibitor) for 21 days and tested every 7 days for aggressive behavior for 28 days. For behavioral testing the animals were placed into an arena ( $2.0\text{ m}^2$ ) with a translucent plastic cylinder (0.4 m radius) inside. One animal was placed in the cylinder, while the tested animal was in the arena. Behavioral tests had duration of 5 minutes, the behavioral interactions were videotaped, and the number of jumps, and pecks directed to the animal that was inside the tube were recorded. The animals were divided into four groups (control, flutamide, finasteride and anastrozole) according to their treatments. The results show that treatment with flutamide, finasteride, or anastrozole were able to reduce aggressive responses of jumps in *Gallus gallus*. In addition, the treatment with anastrozole reduced the number of pecks on day 28 of the experiment. Once the aggressive responses of jumps were reduced by inhibition of testosterone action or its conversion into their metabolites can conclude the current model for aggression with *Gallus gallus* can be used to study aggressive behavioral responses.

**Key-words:** Aggressive behavior, Estradiol, Roosters, Testosterone.

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O comportamento agressivo de um animal pode ser definido como uma ação física ofensiva ou ameaçadora, seja ela agressão, defesa, submissão ou escape (UMUKORO et al., 2013). Podendo ser considerado como um comportamento que implica em danos, ferimentos ou somente ameaças ao indivíduo (BERKOWITZ, 1983; SIEGEL et al., 2007). A agressão é um dos principais comportamentos relacionados à competição por recursos limitados, variando de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais. Assim a agressividade é uma resposta comportamental comum à maioria das espécies de vertebrados durante suas interações sociais (BLACK et al., 2011), tendo uma importante função biológica na fixação de recursos para o sucesso reprodutivo e transmissão de genes (ROSVALL et al., 2014). Na natureza tais respostas podem ser elucidadas em várias circunstâncias, como durante a competição por fêmeas, aquisição de alimentos, defesa territorial, proteção da prole e manutenção da hierarquia dentro dos grupos sociais (DUCKWORTH e BADYAEV, 2007). Sendo assim o comportamento agressivo é visto como uma resposta adaptativa, a qual contribui de modo importante para o sucesso evolutivo das espécies (UMUKORO et al., 2013). A agressão em aves de produção resulta em lesões cutâneas o que pode ocasionar em canibalismo, tornando-se uma preocupação para saúde e bem estar (TABLANTE, et al., 2000; APPLEBY; HUGHES, 1991).

Atualmente, existem diversos modelos para o estudo da agressão, que podem ser encontradas em todas as classes de vertebrados. O desenvolvimento de novos modelos animais, que simulem desordens agressivas específicas podem levar a descobertas adicionais sobre os mecanismos que estão por trás da agressão (UMUKORO et al., 2013). A utilização de modelos animais com o uso de roedores, aves silvestres e primatas, tem sido largamente utilizada para o estudo do comportamento, havendo limitações específicas quanto à utilização destes animais e da qualidade dos resultados obtidos (DEMAS et al., 2007). Um dos maiores obstáculos metodológicos para desenvolvimento dos modelos de agressividade reside no fato de que a maioria dos animais de laboratório passaram por um

processo de domesticação que está associada com inúmeras mudanças na fisiologia, na morfologia e no comportamento, reduzindo a agressividade desses animais quando comparada com seus parentes selvagens (PLYUSNINA et al., 2011). Consequentemente para obter níveis apreciáveis de agressividade nos animais de laboratório, vários procedimentos devem ser empregados para aumentar sua tendência natural de demonstrar tais comportamentos.

A domesticação das galinhas teve inicio na Tailândia e regiões vizinhas no sudeste asiático (FUMIHITO et al., 1994; FUMIHITO et al., 1996; WOOD-GUSH, 1959), essas aves foram depois levadas à China por volta de 6000 a.C. (WEST e ZHOU, 1988). Atualmente as espécies de galinhas estão distribuídas em todo o globo e o seu papel na sociedade é geralmente como fonte de alimento (carne e ovos), entretenimento (rinhos de galos) e ornamental (KOMIYAMA et al., 2004). Sendo o Red Jungle (*Gallus gallus*) considerado também como uma ave ancestral das galinhas domésticas (COLLIAS e COLLIAS, 1967 *apud* JOHNSEN e ZUK, 1995). Em particular, as aves de combate apresentam agressividade inata, como observado a campo no Red Jungle, iniciando com respostas agressivas dirigidas frequentemente a outro macho adulto da mesma espécie (JOHNSEN e ZUK, 1995). No caso dos animais de combate, a seleção feita pelo homem ao longo dos anos ocorreu no sentido de preservar animais com características físicas e comportamentais que favoreciam seu uso em rinhos. Portanto, apesar das questões éticas e legais que envolvem o uso dessas aves em combates, é inegável o potencial que esses animais possuem para expressar comportamentos agressivos. Nestes animais as respostas de agressividade são apresentadas em todos os machos adultos quando confrontados com outros machos da mesma espécie. Assim, devido a suas características comportamentais, as aves de combate constituem um interessante modelo para o estudo da agressividade.

No que diz respeito aos mecanismos envolvidos na regulação do comportamento agressivo, em 1845 um experimento clássico conduzido por Arnold Berthold mostrou que a retirada dos testículos de frangos jovens, reduzia os caracteres sexuais secundários e os comportamentos típicos de machos, como por exemplo, a agressividade direcionada a outros machos. Além disso, o transplante de testículos nesses indivíduos era capaz de restaurar os comportamentos agressivos

(QUIRING, 1944), sugerindo o envolvimento de hormônios gonadais na modulação das respostas de agressividade. Neste sentido estudos posteriores mostraram que o implante de testosterona em galos castrados ou intactos era capaz de estimular respostas de agressividade (BARFIELD, 1971 e WINGFIELD, 1984). Adicionalmente, estudos mais recentes vêm correlacionando os níveis plasmáticos de testosterona com comportamentos territoriais e agressivos (CHARLIER et al., 2011; CARMER, 2012; CUNNINGHAM et al., 2012; ROSVALL et al., 2012; BRUNS et al., 2013), incluindo guarda de fêmeas (SOMA, 2006), comportamento de canto (DE RIDDER et al., 2000; FOERSTER et al., 2002; PASCH et al. 2011), corte (FUSANI et al., 2007), e ao sucesso de copula (RAOUF et al., 1997; BALTTHAZART et al., 2002; REDPATH et al., 2006) em pássaros.

A testosterona é um hormônio esteroidal que tem sua ação em receptores intracelulares. Uma vez no interior das células, este hormônio pode ser convertida em 5-dihidrotestosterona (5-DHT) ou estrogênio pela ação das enzimas 5-alfa-redutase (CUNNINGHAM et al., 2012) e aromatase respectivamente (SIMPSON et al., 2002; BLACK, 2011; CHARLIER, 2011), sendo muitas vezes o efeito biológico da testosterona dependente dessa conversão intracelular (BALTTHAZART et al., 2002). Neste sentido diversos estudos tem verificado o envolvimento da 5-DHT e do estradiol na modulação dos comportamentos agressivos (BALTTHAZART et al., 2002; NELSON e TRAINOR, 2007; CHARLIER et al., 2011; CUNNINGHAM et al., 2012; ROSVALL et al., 2012). Tais estudos têm mostrado que em aves a aromatização da testosterona em estradiol é importante para agressão durante a temporada de acasalamento (ARCHAWARANON e WILEY, 1988; SCHILINGER e CALLARD, 1989; WALTERS e HARDING, 1988). Especificamente, o uso associado de um antagonista de testosterona com um inibidor da conversão de testosterona em estrogênio reduziu a agressão territorial durante a época do acasalamento (CANOINE e GWINNER, 2002). Os hormônios sexuais esteróides são excelentes candidatos para mediar a integração de informações internas e externas em uma resposta comportamental adaptativa.

Tendo em vista a já comprovada função dos hormônios sexuais na regulação do comportamento agressivo de aves, o objetivo é apresentar uma proposta de validar o modelo de estudo do comportamento agressivo com a utilização de *Gallus*

*gallus*, através da inibição da ação da testosterona e dos seus metabólitos, 5-DHT e estradiol.

## **CAPITULO I**

### **Validação de um modelo de agressividade com *Gallus gallus***

Manuscrito submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

## **Validação de um modelo de agressividade com *Gallus gallus***

**Osvaldo Barbosa<sup>1\*</sup>, Johann S. de Farias<sup>2</sup>, Marcos Vinícius B Araujo<sup>2</sup>, Warlen S Pereira<sup>2</sup>, Anderson S Avelino<sup>2</sup>, Luis Felipe S. da Silva<sup>3</sup>**

**ABSTRACT** – Barbosa O., Farias J.S., Borges M.V., Pereira W.S., Avelino A.S., da Silva L.F.S. **[Validation of a study model for aggression with *Gallus gallus*]** Validação de um modelo de agressividade com *Gallus gallus* Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Areia, Paraíba, Brasil. E-mail: osvaldo\_sb@yahoo.com.br

The objective of the current study was to validate a new study model for aggression using *Gallus gallus* by evaluating their aggressive responses after inhibition of the testosterone action or its conversion to dihydrotestosterone or estradiol. For this, we used 48 roosters (*Gallus gallus*) divided in pairs. During the experiment the animals were treated daily with Flutamide (antiandrogen), Finasteride (inhibitor of 5 alpha-reductase) or anastrozole (aromatase inhibitor) for 21 days and tested every 7 days for aggressive behavior for 28 days. For behavioral testing the animals were placed into an arena (2.0 m<sup>2</sup>) with a translucent plastic cylinder (0.4 m radius) inside. One animal was placed in the cylinder, while the tested animal was in the arena. Behavioral tests had duration of 5 minutes, the behavioral interactions were videotaped, and the number of jumps, and pecks directed to the animal that was inside the tube were recorded. The animals were divided into four groups (control, flutamide, finasteride and anastrozole) according to their treatments. Our results show that treatment with flutamide, finasteride, or anastrozole were able to reduce aggressive responses of jumps in *Gallus gallus*. In addition, the treatment with anastrozole reduced the number of pecks on day 28 of the experiment. Once the aggressive responses of jumps were reduced by inhibition of testosterone action or its conversion into their metabolites we can conclude the current model for aggression with *Gallus gallus* can be used to study aggressive behavioral responses.

**INDEX TERMS:** aggressive behavior, estradiol, roosters, testosterone.

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Areia, Paraíba, Brasil. \* Autor para correspondência: osvaldo\_sb@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Educação em Saúde, Campus Professor Antônio Garcia Filho, Universidade Federal de Sergipe (UFS), R. Padre Álvares Pitangueira, 258 - Lagarto, Sergipe, Brasil.

**RESUMO** - O objetivo do presente trabalho foi validar um novo modelo de estudo de agressividade utilizando *Gallus gallus* através da avaliação das respostas agressivas após a inibição da ação da testosterona ou da sua conversão em diidrotestosterona ou estradiol. Para tanto, foram usados 48 galos (*Gallus gallus*) os quais foram divididos em duplas. Durante o experimento os animais foram tratados diariamente com Flutamida (antiandrógeno), Finasterida (inibidor da 5 alfa-redutase) ou Anastrozol (inibidor da aromatase), por 21 dias e testados por 28 dias para o comportamento agressivo a cada 7 dias. Durante o teste comportamental os animais foram colocados no interior de uma arena (2,0 m<sup>2</sup>) com um cilindro de material plástico translucido (0,4 m de raio) no seu interior. Um dos animais foi colocado no cilindro, enquanto que, o animal que seria testado ficava livre na arena. Os testes comportamentais tiveram duração de 5 minutos, as interações comportamentais foram filmadas e o número de saltos e bicadas direcionadas ao animal que se encontrava no interior do cilindro foram contabilizados. Os animais foram divididos em quatro grupos (controle, flutamida, finasterida e anastrozol) de acordo com seus tratamentos. Os resultados mostraram que o tratamento com flutamida, finasterida ou anastrozol foram capazes de reduzir as respostas agressivas de saltos em *Gallus gallus*. Além disso, o tratamento com anastrozol reduziu o número de bicadas aos 28 dias de experimento. Uma vez que as respostas agressivas de salto foram reduzidas após a inibição da ação da testosterona ou da sua conversão em diidrotestosterona ou estradiol, podemos concluir que o modelo de agressividade com *Gallus gallus* pode ser utilizado para estudo de respostas comportamentais agressivas.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** comportamento agressivo, estradiol, galos, testosterona.

## **INTRODUÇÃO**

A agressividade animal é uma resposta comportamental comum à maioria das espécies de vertebrados durante suas interações sociais. Ela constitui um comportamento no qual há ameaça de injuria ou provoca injuria, lesão ou destruição de outro organismo (Siegel et al. 2007). Na natureza tais respostas podem ser elucidadas em várias circunstâncias, como durante a competição por fêmeas ou alimentos, aquisição e defesa territorial, proteção da prole e manutenção da hierarquia dentro dos grupos sociais (Duckworth & Badyaev 2007). Sendo assim o comportamento agressivo é visto como uma resposta adaptativa, a qual contribui de modo importante para o sucesso evolutivo das espécies. Contudo no caso de animais de produção os comportamentos agressivos dificultam o manejo, aumentam o estresse social e podem levar a lesões corporais. A agressão em aves de produção resulta em lesões cutâneas o que pode ocasionar em canibalismo, tornando-se uma preocupação para saúde e bem estar (Appleby & Hogarth 1997, Tablante et al. 2000). Sendo assim o estudo dos mecanismos responsáveis pela resposta agressividade são de suma importância já que pode auxiliar no desenvolvimento de métodos que possibilitem a redução deste comportamento indesejado.

Recentemente o nosso laboratório caracterizou um modelo para estudo de comportamentos agressivos, utilizando *Gallus gallus* (Farias & Silva 2012). Esse modelo consiste na observação de respostas comportamentais agressivas (saltos e bicadas) de galos direcionados contra outro macho da mesma espécie, o qual se encontra no interior de um cilindro de plástico transparente. Contudo apesar deste modelo parecer promissor para o estudo de respostas agressivas de *Gallus gallus*, ele ainda carece de um estudo que o valide.

Desde o experimento clássico conduzido por Arnold Berthold que os hormônios sexuais tem sido correlacionados com a expressão de comportamentos agressivos (Quiring, 1944). Neste sentido estudos posteriores mostraram que o uso, através de implantes de testosterona em galos castrados ou intactos era capaz de estimular respostas de agressividade (Barfield 1971 & Wingfield 1984).

Adicionalmente, estudos mais recentes vêm correlacionando os níveis plasmáticos de testosterona com comportamentos territoriais e agressivos, incluindo guarda de fêmeas (Soma 2006), comportamento de canto (De Ridder, Pinxten & Eens 2000 & Foerster et al. 2002), corte (Fusani et al. 2007), e ao sucesso de cópula (Raouf et al. 1997 & Redpath et al. 2006) em pássaros.

Além da testosterona estudos recentes tem mostrado que os comportamentos defensivos dependem da conversão da testosterona em seus metabólitos, a 5 dihidrotestosterona (5-DHT) ou o estradiol. Neste sentido a aromatização da testosterona em estradiol é importante para agressão durante a temporada de acasalamento de aves (Archawaranon & Wiley, 1988, Shclinger & Arnold 1992 & Walters & Harding 1988). Especificamente o uso associado de um antagonista de testosterona com um inibidor da conversão de testosterona em estrogênio reduziu a agressão territorial durante a época do acasalamento (Canoine & Gwinner 2002).

Tendo em vista a já comprovada função dos hormônios sexuais na regulação do comportamento agressivo de aves, o objetivo foi validar o modelo de estudo do comportamento agressivo de *Gallus gallus* através da inibição da ação da testosterona e dos seus metabólitos 5-DHT e estradiol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Neste estudo foram utilizados 48 galos adultos (*Gallus gallus*) pesando entre 2,5 e 3,5 kg. Esses animais foram alojados em gaiolas individuais, medindo 80x80x70 cm (AxLxC), no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Os animais receberam alimentação comercial específica para e água a vontade, com o ciclo claro-escuro de 12 horas. Este estudo foi realizado com quatro grupos de seis animais, totalizando 24 animais testados e mais 24 animais que foram utilizados como adversários. Os galos foram selecionados levando em consideração o peso e

a idade, a qual se expressava pelas características externas como tamanho da crista.

## **Drogas**

Foram utilizadas as seguintes drogas: flutamida, um antiandrógeno; anastrazol, um inibidor da aromatase (enzima pela conversão de testosterona em estrogênio) e a finasterida um inibidor da 5 $\alpha$ -redutase (enzima responsável pela conversão da testosterona em 5-DHT). Cada grupo foi tratado com um comprimido diário. Para a escolha das doses, procuramos as que continham a menor dose comercial por comprimido, para evitar o fracionamento dos mesmos. A dosagem foi estabelecida aleatoriamente. As drogas em forma de comprimido eram administradas diretamente no bico dos animais. Os animais do grupo controle foram tratados com comprimidos feitos de amido de milho prensado.

### **Flutamida**

Neste protocolo seis animais foram tratados com comprimidos de flutamida (Teoflut® 250mg. Os animais receberam doses consecutivas de compridos de flutamina (FLU) do dia 1 ao dia 21. Estes animais foram testados com seus pares em um intervalo regular de 7 dias.

### **Finasterida**

Neste protocolo seis animais foram tratados com comprimidos de finasterida (Finasterida 1mg),. Os animais receberam doses consecutivas de comprimidos de finasterida (FIN) do dia 1 ao dia 21. Estes animais foram testados com seus pares em um intervalo regular de 7 dias.

### **Anastrazol**

Neste protocolo seis animais foram tratados com dihidroxiflavona (Anastrazol 1mg),. Os animais receberam doses consecutivas de comprimidos de anastrazol (ANA) do

dia 1 ao dia 21. Estes animais foram testados com seus pares em um intervalo regular de 7 dias.

### **Teste comportamental**

Para a análise das respostas comportamentais de agressividade, os animais foram colocados, em duplas, no interior da arena de 2,0 m<sup>2</sup> e avaliados por 5 minutos. O animal avaliado ficava livre na arena, enquanto o oponente ficava no interior de um círculo feito de polietileno, translucido e flexível, com raio de 40,0 cm por 1,0 m de altura, Os experimentos foram realizados em intervalos regulares de 07 (sete) dias, isto é, dias 0, 07, 14, 21 e 28. Sendo que no dia 0 os animais foram testados sem que recebessem qualquer droga. Posterior ao dia 0 os animais de cada grupo receberam as suas respectivas drogas, excetuando-se os animais do grupo controle.

Antes das sessões experimentais todos os animais foram previamente habituados, durante cinco minutos, por três dias consecutivos, na arena de testes comportamentais. Para os testes comportamentais, os animais foram divididos em duplas, com base no peso das aves, e uma vez formado a dupla, esta permaneceu por todo o experimento. No dia do teste comportamental os animais foram colocados na arena, por cinco minutos, com o galo adversário no interior do cilindro e suas respostas comportamentais foram filmadas para posterior análise. Entre as sessões experimentais a arena de testes e os outros aparelhos foram cuidadosamente limpos.

### **Análise comportamental**

Os vídeos gravados durante as sessões experimentais foram avaliados posteriormente por um observador treinado. A análise das respostas comportamentais de agressividade consistiu, a partir do início do confronto, na mensuração do número de bicadas e saltos direcionados a origem do estímulo.

Consideramos como bicada toda vez que a ave atingia o polietileno do cilindro, com o intuito de atingir o oponente. Os saltos foram contabilizados toda vez que os animais levantavam uma ou ambas as patas do chão com objetivo de atingir o oponente no interior do cilindro.

## Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos em valores médios  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Os testes comportamentais foram analisados por meio de uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). No caso do ANOVA as diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas pelo pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os nossos resultados mostraram que os animais do grupo controle quando submetidos ao confronto apresentaram respostas agressivas de bicadas e saltos que não variaram, significativamente, ao longo do tempo ( $p > 0,05$ ). Tal resultado mostra que as respostas agressivas de bicadas e saltos, de *Gallus gallus*, não se alteraram ao longo das semanas e resistiram a repetições (Figura 1A - B).

A administração da flutamida por 21 dias não promoveu alterações significativas no número de bicadas de *Gallus gallus* ( $p > 0,05$ ; Figura 2A). Por outro lado, tal tratamento reduziu significativamente o número de saltos emitidos contra o rival a partir do 14º dia de tratamento e persistiu até o término do experimento ( $p < 0,05$ ; Figura 2B). Além disso, a interrupção do tratamento aos 21 dias não foi capaz de reverter a redução nas respostas comportamentais de saltos aos 28 dias, indicando uma persistência do efeito da droga.

Uma vez que a flutamida pode inibir a ligação da testosterona e da 5-DHT a seus receptores tratou-se um novo grupo de animais com a finasterida. Semelhante ao tratamento com flutamida o tratamento com finasterida, por 21 dias não alterou significativamente o número médio de bicadas ao longo do período experimental ( $p > 0,05$ , Figura 3A). Contudo a administração de finasterida por 21 dias foi capaz de reduzir significativamente o número médio de saltos emitidos contra os rivais a partir do sétimo dia de experimento ( $p < 0,05$ ; Figura 3B). Mesmo após o término do tratamento a redução na resposta agressiva de saltos permaneceu até o vigésimo oitavo dia experimental.

O tratamento com anastrozol, um inibidor da aromatase, produziu uma redução significativa no número de bicadas no 28º dia ( $p < 0,05$ , Figura 4A). Além disso, tal tratamento também reduziu significativamente o número de saltos direcionados ao galo rival a partir do 14º dia de tratamento ( $p < 0,05$ , Figura 4B).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento com os antiandrógenos flutamida ou finasterida foram capazes de reduzir as respostas agressivas de saltos em *Gallus gallus*. Contudo, administração desses medicamentos não alterou as respostas comportamentais de bicadas direcionadas aos rivais. Além disso, o anastrozol reduziu as respostas agressivas de bicadas e saltos em *Gallus gallus*. Esse conjunto de dados sugerem que os comportamentos agressivos de *Gallus gallus* estão sob influência direta da testosterona e de seus metabólitos como o 5-DHT e o estradiol. Além disso, nossos estudos suportam ainda o uso do presente modelo para estudo de comportamentos agressivos.

A participação dos esteroides gonadais, particularmente a testosterona, em mediar o comportamento agressivo já está bem estabelecida entre os vertebrados (DEMAS et al. 2007, CHARLIER et al. 2011 e CRAMER 2012). Neste sentido Estudos posteriores mostraram que o implante de testosterona em galos castrados

ou intactos era capaz de estimular respostas de agressividade (BARFIELD 1971 & WINGFIELD, 1984). Adicionalmente, estudos mais recentes vêm correlacionando os níveis plasmáticos de testosterona com comportamentos territoriais e agressivos (Charlier et al. 2011, Carmer 2012, Cunningham et al. 2012, Rosvall et al. 2012 & Bruns, Rosvall & Keterson 2013), incluindo guarda de fêmeas (Soma 2006), comportamento de canto (De Ridder, Pinxten & Eens 2000, Foerster et al. 2002 & Pasch et al. 2011), corte (Fusani et al. 2007), e ao sucesso de cópula (Raouf et al. 1997, Baltthazar, Baillien & Bal 2002 & Redpath et al. 2006,) em pássaros. Corroborando estes estudos, os resultados obtidos com o nosso modelo de agressividade mostraram que a administração da flutamida, foi capaz de reduzir o número de respostas agressivas de saltos em *Gallus gallus*. A flutamida é um antiandrógeno que bloqueia a ação da testosterona de origem testicular e adrenal nos tecidos-alvo. Os resultado sugere que, possivelmente, as respostas comportamentais relacionadas a saltos, observadas no presente estudo, podem ser associadas a interações agressivas desses animais em ambiente selvagem.

Contudo, o tratamento com flutamida reduziu apenas as respostas agressivas de saltos, mas não alterou a quantidade de bicadas. Uma possível justificativa para tal resultado, está no fato de as bicadas estarem relacionadas com outras como, por exemplo, respostas exploratórias. Assim, como as bicadas não indicam apenas agressividade, a inibição da ação da testosterona não foi capaz de modificar tal resposta em *Gallus gallus*. Desta forma durante o estudo as bicadas direcionadas aos galos de dentro do cilindro manteve-se constante em relação ao número de saltos, sendo este um indicador de agressividade mais eficiente que as bicadas.

De modo semelhante ao tratamento com a flutamida, através da inibição da conversão da testosterona em 5-DHT, pela finasterida reduziu as respostas agressivas de saltos em *Gallus gallus* sem alterar o número de bicadas, indicando que parte do efeito da testosterona sobre o comportamento agressivo de saltos, depende da sua conversão em 5-DHT. Suportando nossos achados, administrações

de testosterona, 5-DHT e estradiol produziram um aumento no número de bicadas e do comportamento dominante contra um manequim de gallo (Groothuis & Ros 2005).

Além da testosterona estudos tem apontado o estradiol como responsável pelos comportamentos agressivos. Neste sentido a conversão de testosterona, no interior da célula alvo, em estradiol e a ação deste em receptores específicos poderia ser o responsável por parte das respostas comportamentais agressivas mediadas por hormônios sexuais. Neste sentido diversos estudos têm mostrado que em aves a aromatização da testosterona em estradiol é importante para agressão durante a temporada de acasalamento (Archawaranon & Wiley 1988, Shclinger & Arnold 1992, Walters & Harding, 1988). Especificamente, o uso associado de um antagonista de testosterona com um inibidor da conversão de testosterona em estrogênio reduziu a agressão territorial durante a época do acasalamento em *Saxicola torquata rubicola* (Canoine & Gwinner 2002). No presente estudo a administração de um inibidor da aromatase reduziu as respostas comportamentais agressivas de salto e bicadas. Assim, os resultados observados na resposta comportamental de saltos do nosso modelo de agressividade, sugerem que esta responde a diferentes manipulações farmacológicas que reconhecidamente são capazes de diminuir comportamentos agressivos.

Assim no presente estudo verificou-se que a inibição da ação da testosterona em seus receptores ou a inibição de sua conversão em 5-DHT ou estradiol seria capaz de reduzir respostas comportamentais de saltos. Esse conjunto de dados nos permite concluir que a resposta comportamental de saltos pode ser considerada durante a avaliação de respostas agressivas de *Gallus gallus*. Por outro lado as respostas de bicadas podem denotar outros comportamentos que não apenas os agressivos. Considerando esses fatores o presente modelo de agressividade com *Gallus gallus* oferece uma nova possibilidade de estudo para comportamentos agressivos.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFRÊNCIAS

- Appleby M.C. & Hogarth G.S. 1997. Welfare of laying hens in cages and alternative systems: Environmental, physical and behavioral aspects. *World Poult Sci J* 47: 109–128.
- Archawaranon M. & Wiley R.H. 1988. Control of aggression and dominance in white-throated sparrows by testosterone and its metabolites. *Horm Behav* 22: 497-517.
- Balthazart J., Baillien M. & Ball G.F. 2002. Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132, 37–55.
- Barfield R.J. 1971. Activation of sexual and aggressive behavior by androgen implanted into the male ring dove brain. *Endocrinology* 89: 1470-1476.
- Burns B., Rosvall K.A. & Ketterson E.D. 2013. Neural steroid sensitivity and aggression: comparing individuals of two songbird subspecies. *Journal of Evolutionary Biology* 26, 820–831.
- Canoine V. & Gwinner E. 2002. Seasonal Differences in the Hormonal Control of Territorial Aggression in Free-Living European Stonechats. *Horm Behav* 41:1-8.
- Charlier T.D., Newman A.E., Heimovics S.A., Po, K.W., Saldanha C.J. & Soma K.K., 2011. Rapid Effects of Aggressive Interactions on Aromatase Activity and Oestradiol in Discrete Brain Regions of Wild Male White-Crowned Sparrows. *Journal of neuroendocrinology* 23, 742–753.
- Cramer E.R. 2012. Are Androgens Related to Aggression in House Wrens? *Ethology* 118, 975–983.

Cunningham R.L., Lumia A.R.& McGinnis, M.Y. 2012. Androgen receptors, sex behavior, and aggression. *Neuroendocrinology* 96, 131–140.

De Ridder E., Pinxten R. & Eens M. 2000. Experimental evidence of a testosterone-induced shift from paternal to mating behaviour in a facultatively polygynous songbird. *Behav Ecol Sociobiol* 49:24–30.

Demas G.E., Cooper M.A., Albers H.E. & Soma K.K. 2007. Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies, in: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer, pp. 337–372.

Duckworth R.A. & Badyaev A.V. 2007. Coupling of dispersal and aggression facilitates the rapid range expansion of a passerine bird. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 104: 15017-15022.

Farias J.S. & Silva L.F.S. 2012 . Efeito da ração em diferentes níveis de triptofano no comportamento agressivo de *gallus gallus giganteus*. Desenvolvimento de um modelo de estudo de comportamento agressivo utilizando galos de briga. XX Encontro de Iniciação Científica da UFPB, Campus III – Bananeiras-PB. (Resumo)

Foerster K., Poesel A., Kunc H. & Kempenaers B. 2002. The natural plasma testosterone profile of male blue tits during the breeding season and its relation to song output. *J Avian Biol* 33: 269–275.

Fusani L., Day L.B., Canoine V., Reinemann D., Hernandez E. & Schlinger B.A. 2007. Androgen and the elaborate courtship behavior of a tropical lekking bird. *Horm Behav* 51: 62–68.

Groothuis T.G.G & Ros A.F.H. 2005. The hormonal control of begging and early aggressive behavior: Experiments in black-headed gull chicks. *Hormones and Behavior*, Kerklaam, v.48, p. 207-215.

- Pasch B., George A.S., Hamlin H.J., Guillette Jr, L.J. & Phelps, S.M. 2011a. Androgens modulate song effort and aggression in Neotropical singing mice. *Hormones and behavior* 59, 90–97.
- Quiring D.P. 1944. Transplantation of testes (by A. A. Berthold). *Bull Hist Med* 16, 399–401.
- Raouf S.A., Parker P.G., Ketterson E.D., Nolan V. & Ziegenfus C. 1997. Testosterone affects reproductive success by influencing extra-pair fertilizations in male dark-eyed juncos (Aves: Juncohyemalis). *Proc R Soc B* 264:1599–1603.
- Redpath S.M., Mougeot F., Leckie F.M. & Evans S.A. 2006. The effects of autumn testosterone on survival and productivity in red grouse, *Lagopus lagopus scoticus*. *Anim Behav* 71:1297–1305.
- Rosvall K.A., Burns C.B., Barske J., Goodson J.L., Schlinger B.A., Sengelaub D.R. & Ketterson E.D. 2012. Neural sensitivity to sex steroids predicts individual differences in aggression: implications for behavioural evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 3547–3555.
- Shclinger B.A. & Arnold A.P. 1992. Circulating estrogens in a male songbird originate in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7650-7653.
- Siegel A., Bhatt S., Bhatt R. & Zalcman S.S. 2007. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. *Curr. Neuropharmacol.*, 5, 135-147.
- Soma K.K. 2006. Testosterone and aggression: berthold, birds and beyond. *J Neuroendocrinol* 18:543–551.

Tablante N.L., Vaillancourt J.P., Martin S.W., Shoukri M. & Estevez I. 2000. Spatial distribution of cannibalism mortalities in commercial laying hens. *Poult. Sci.*, 79, 705-708.

Walters M.J. & Harding C.F. 1988. The effects of an aromatization inhibitor on the reproductive behavior of male zebra finches. *Horm Behav*, 22: 207-218.

Wingfield J.C. 1984. Androgens and mating systems: Testosterone-induced polygyny in normally monogamous birds. *Auk*. 101, 665–671; 1984.

## **Legendas das Figuras**

Fig.1. Número médio  $\pm$  EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por *Gallus gallus* do grupo controle, contra o rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias.

Fig.2. Número médio  $\pm$  EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por *Gallus gallus* do grupo tratado com Flutamida, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. \*  $p < 0,05$  quando comparado com a L.B.

Fig.3. Número médio  $\pm$  EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por *Gallus gallus* do grupo tratado com Finasterida, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. \*  $p < 0,05$  quando comparado com a L.B.

Fig.4. Número médio  $\pm$  EPM de bicadas (A) e saltos (B) apresentados, por *Gallus gallus* do grupo tratado com Anastrozol, contra seu rival ao longo do tempo nos diferentes dias, sendo as medidas no dia zero (linha de base, LB), 7, 14, 21 e 28 dias. \*  $p < 0,05$  quando comparado com a L.B.

## Figuras

Figura 1

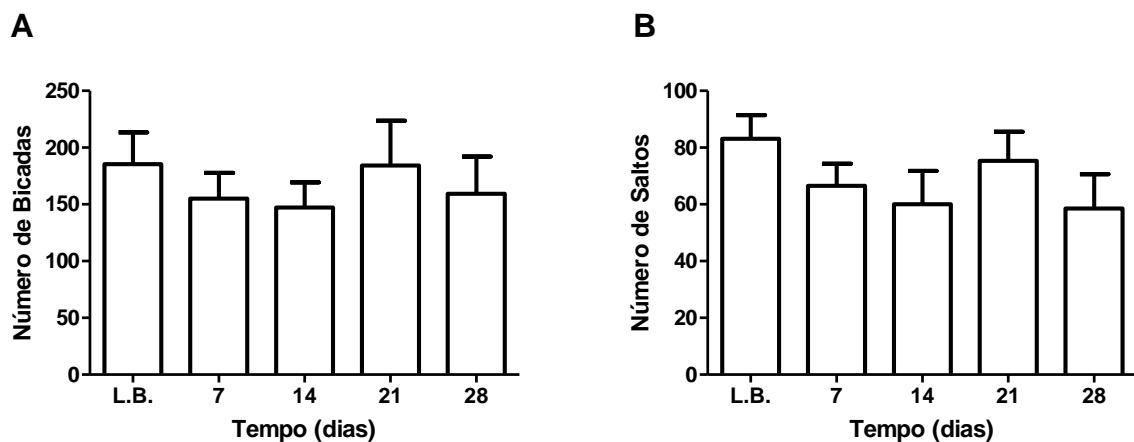


Figura 2

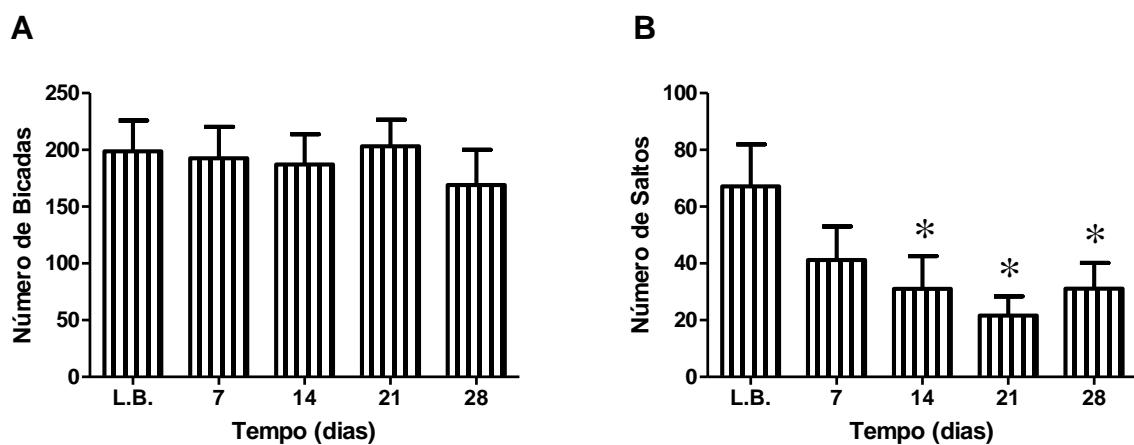


Figura 3

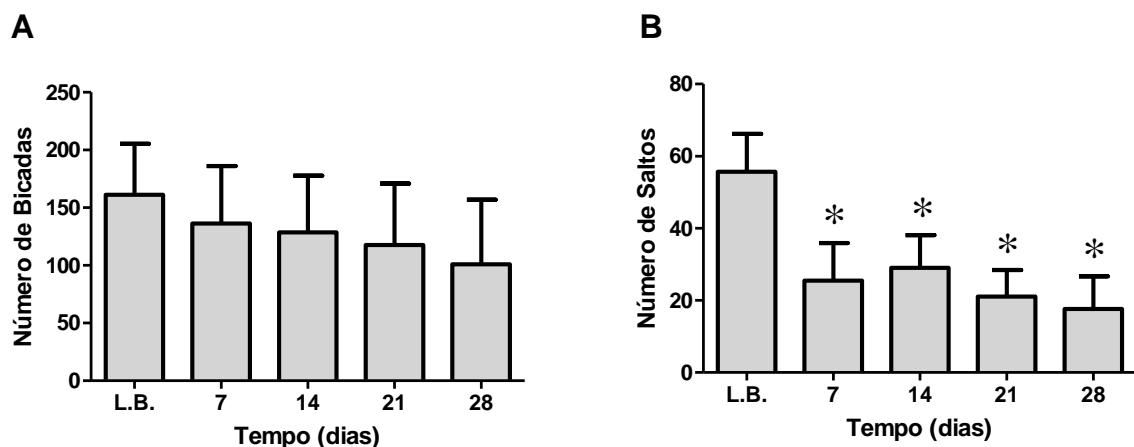
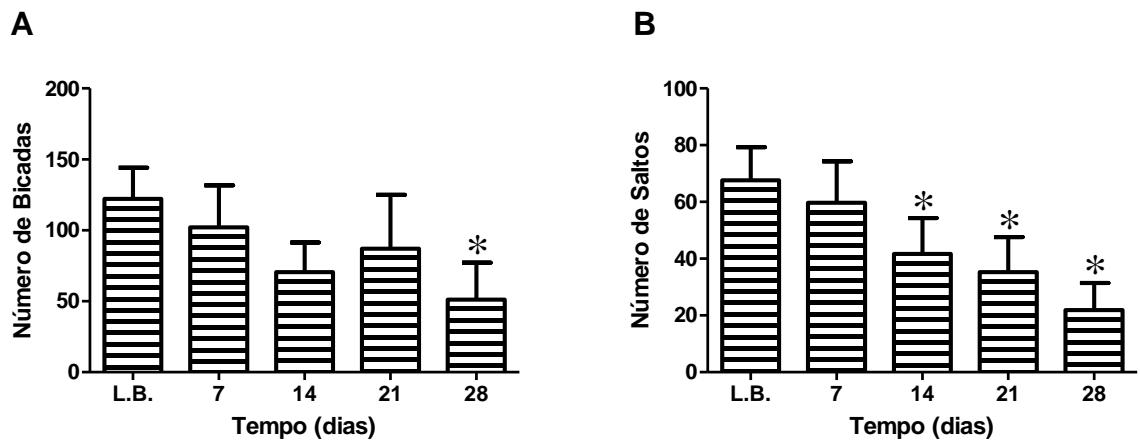


Figura 4



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo possibilitou uma proposta de validação de um modelo de agressividade usando *Gallos gallos*. Reconhecidamente nas espécies domésticas, sejam elas de produção ou companhia, os comportamentos agressivos são indesejáveis. No caso dos animais de produção comportamentos agressivos dificultam o manejo, aumentam o estresse social e podem levar a lesões corporais. Sendo assim o desenvolvimento de um modelo animal capaz de demonstrar respostas comportamentais agressivas de maneira inata é de grande valia para o estudo dessas respostas comportamentais.

Sendo assim, o Laboratório de Fisiologia Animal do Centro de Ciências Agrárias desenvolveu um modelo animal, utilizando *Gallus gallus*, no qual os animais apresentaram respostas comportamentais agressivas de maneira inata, permitindo assim, o estudo da agressividade através de sua expressão de maneira espontânea e natural. Contudo apesar deste modelo parecer promissor, ele ainda carece de um estudo que o valide.

O presente modelo oferece algumas vantagens uma vez que nesses animais o comportamento agressivo direcionado a outros machos ocorre de maneira inata e persiste a várias repetições como visto no presente estudo. Assim, a validação do nosso modelo possibilita o estudo de comportamentos agressivos em *Gallus gallus* permitindo assim, a partir de agora a realização de pesquisas relacionadas com o mecanismos envolvidos com o controle da agressividade, descoberta e avaliação de fármacos capazes de reduzir tal comportamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Archawaranon M.; Wiley R.H., 1988. Control of aggression and dominance in white-throated sparrows by testosterone and its metabolites. Horm. Behav. 22: 497-517.
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2002. Interactions between aromatase (estrogen synthase) and dopamine in the control of male sexual behavior in quail. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 132, 37–55.
- Barfield, R.J., 1971. Activation of sexual and aggressive behavior by androgen implanted into the male ring dove brain. Endocrinology 89: 1470-1476.
- Black, M.P., Balthazart, J., Baillien, M., Grober, M.S., 2011. Rapid increase in aggressive behavior precedes the decrease in brain aromatase activity during socially mediated sex change in *Lythrypnus dalli*. General and comparative endocrinology 170, 119–124.
- Burns, B., Rosvall, K.A., Ketterson, E.D., 2013. Neural steroid sensitivity and aggression: comparing individuals of two songbird subspecies. Journal of evolutionary biology 26, 820–831.
- Canoine V., Gwinner E., 2002. Seasonal Differences in the Hormonal Control of Territorial Aggression in Free-Living European Stonechats. Horm Behav 41:1-8.
- Charlier, T.D., Newman, A.E., Heimovics, S.A., Po, K.W., Saldanha, C.J., Soma, K.K., 2011. Rapid Effects of Aggressive Interactions on Aromatase Activity and Oestradiol in Discrete Brain Regions of Wild Male White-Crowned Sparrows. Journal of neuroendocrinology 23, 742–753.
- Collias, N.E., Collias, E.C., 1967. A Field Study of the Red Jungle Fowl in North-Central India. The Condor 69, 360–386.

Cramer, E.R., 2012. Are Androgens Related to Aggression in House Wrens? *Ethology* 118, 975–983.

Cunningham, R.L., Lumia, A.R.& McGinnis, M.Y., 2012. Androgen receptors, sex behavior, and aggression. *Neuroendocrinology* 96, 131–140.

De Ridder, E., Pinxten, R., Eens, M., 2000. Experimental evidence of a testosterone-induced shift from paternal to mating behaviour in a facultatively polygynous songbird. *Behav Ecol Sociobiol* 49:24–30.

Demas, G.E., Cooper, M.A., Albers, H.E., Soma, K.K., 2007. Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies, in: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer, pp. 337–372.

Duckworth, R.A., Badyaev, A.V., 2007. Coupling of dispersal and aggression facilitates the rapid range expansion of a passerine bird. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 104: 15017-15022.

Foerster, K., Poesel, A., Kunc, H., Kempenaers, B., 2002. The natural plasma testosterone profile of male blue tits during the breeding season and its relation to song output. *J Avian Biol* 33:269–275.

Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takada, M., Ohno, S., Kondo, N., 1994. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91: 12505-12509.

Fumihito, A., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Kondo, N., Ohno, S., 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 93, 6792-6795.

Fusani, L., Day, L.B., Canoine, V., Reinemann, D., Hernandez, E., Schlinger, B.A., 2007. Androgen and the elaborate courtship behavior of a tropical lekking bird. *Horm Behav* 51:62–68.

Johnsen, T.S., Zuk, M., 1995. Testosterone and aggression in male red jungle fowl. *Hormones and behavior* 29, 593–598.

Komiyama, T., Ikeo, K., Gojobori, T., 2004. The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *Gene*, 333, 91-99.

Nelson, R.J., Trainor, B.C., 2007. Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8, 536–546.

Pasch, B., George, A.S., Hamlin, H.J., Guillette Jr, L.J., Phelps, S.M., 2011a. Androgens modulate song effort and aggression in Neotropical singing mice. *Hormones and behavior* 59, 90–97.

Plyusnina, I.Z., Solov'eva, M.Y., Oskina, I.N., 2011. Effect of domestication on aggression in gray Norway rats. *Behavior genetics* 41, 583–592.

Quiring, D.P., 1944. Transplantation of testes (by A. A. Bethold). *Bull Hist Med* 16, 399–401.

Raouf, S.A., Parker P.G., Ketterson E.D., Nolan V., Ziegenfus C., 1997. Testosterone affects reproductive success by influencing extra-pair fertilizations in male dark-eyed juncos (Aves: Juncohyemalis). *Proc R Soc B* 264:1599–1603.

Redpath, S.M., Mougeot F., Leckie F.M., Evans S.A., 2006. The effects of autumn testosterone on survival and productivity in red grouse, *Lagopus lagopus scoticus*. *Anim Behav* 71:1297–1305.

Rosvall, K.A., Burns, C.B., Barske, J., Goodson, J.L., Schlänger, B.A., Sengelaub, D.R., Ketterson, E.D., 2012. Neural sensitivity to sex steroids predicts individual differences in aggression: implications for behavioural evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 3547–3555.

Schlänger, B.A., Callard, G.V., 1989. Aromatase Activity in Quail Brain: Correlation with Aggressiveness\*. *Endocrinology* 124, 437–443.

Siegel, A., Bhatt, S., Bhatt, R., Zalcman, S.S., 2007. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. *Curr. Neuropharmacol.*, 5, 135-147.

Simpson, E.R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W.C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., Jones, M., 2002. Aromatase-a brief overview. *Annual review of physiology* 64, 93–127.

Soma, K.K., 2006. Testosterone and aggression: berthold, birds and beyond. *J Neuroendocrinol* 18:543–551.

Umukoro, S., Aladeokin, A.C., Eduviere, A.T., 2013. Aggressive behavior: A comprehensive review of its neurochemical mechanisms and management. *Aggression and violent behavior* 18, 195–203.

Walters, M.J., Harding C.F., 1988. The effects of an aromatization inhibitor on the reproductive behavior of male zebra finches. *Horm Behav*, 22: 207-218.

West, B., Zhou, B.X., 1988. Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archeological Science*, 14, 515-533.

West, B., Zhou, B.X., 1988. Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archeological Science*, 14, 515-533.

Wingfield, J.C., 1984. Androgens and mating systems: Testosterone-induced polygyny in normally monogamous birds. *Auk*. 101, 665–671; 1984.

Wood-Gush, D.G.M., 1959. A history of the domestic chicken from antiquity to the 19th century. *Poultry Science*, 38, 321-326.