

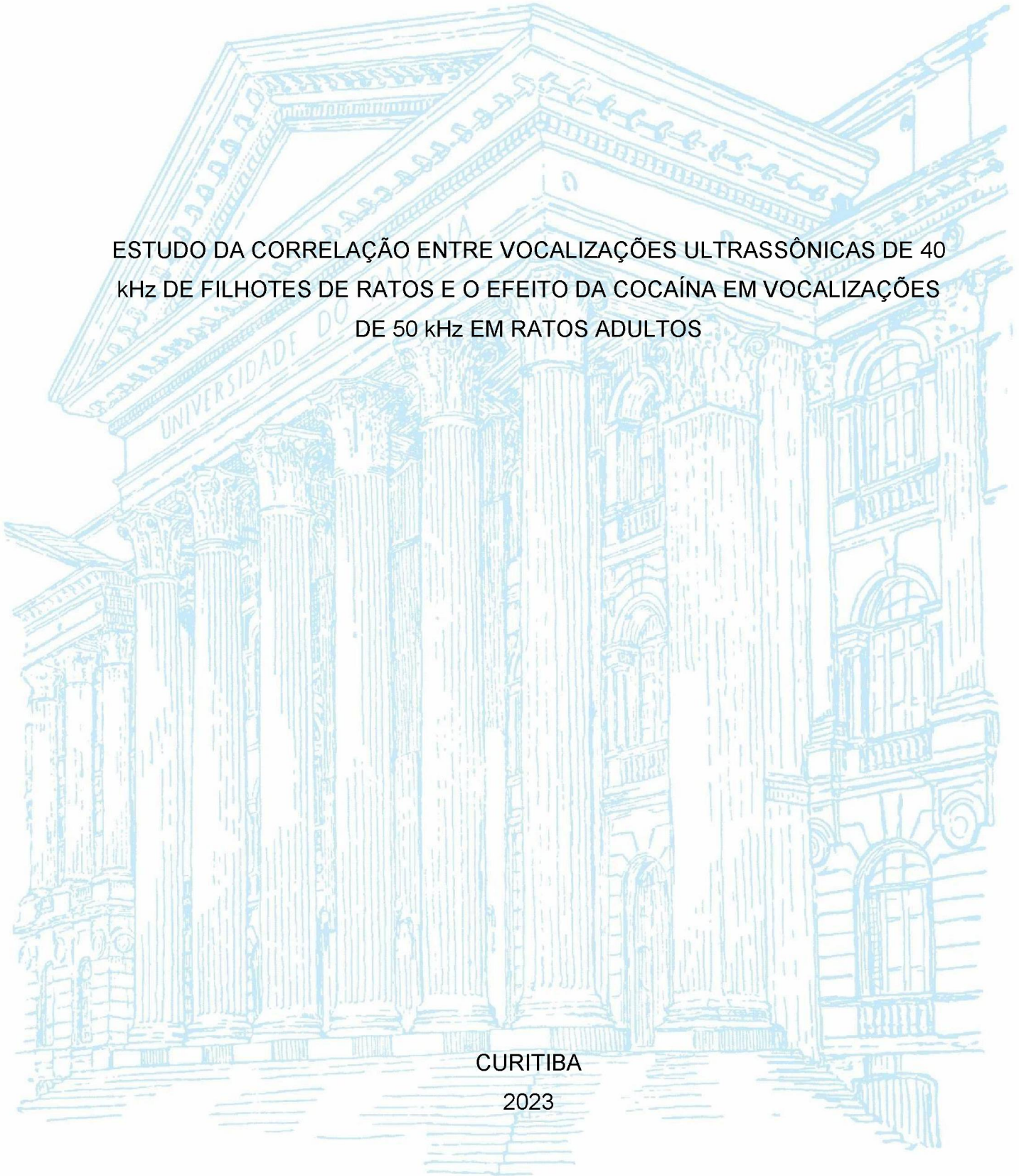
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NÍCOLAS CORDEIRO

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 40
kHz DE FILHOTES DE RATOS E O EFEITO DA COCAÍNA EM VOCALIZAÇÕES
DE 50 kHz EM RATOS ADULTOS

CURITIBA

2023



NÍCOLAS CORDEIRO

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 40
kHz DE FILHOTES DE RATOS E O EFEITO DA COCAÍNA EM VOCALIZAÇÕES
DE 50 kHz EM RATOS ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha
Coorientador: Dr. José Augusto Pochapski

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Cordeiro, Nicolas

Estudo da correlação entre vocalizações ultrassônicas de 40 kHz de filhotes de ratos e o efeito da cocaína em vocalizações de 50 kHz em ratos adultos / Nicolas Cordeiro. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha.

Coorientador: Dr. José Augusto Pochapski.

1. Cocaína. 2. Vocalização animal. 3. Animais - Filhotes. 4. Rato. 5. Ciclo estral. I. Cunha, Cláudio da, 1962-. II. Pochapski, José Augusto, 1993. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e tres às 13:30 horas, na sala Anfiteatro da Farmacologia, Departamento de Farmacologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **NICOLAS CORDEIRO**, intitulada: **ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 40 kHz DE FILHOTES DE RATOS E O EFEITO DA COCAÍNA EM VOCALIZAÇÕES DE 50 kHz EM RATOS ADULTOS**, sob orientação do Prof. Dr. CLAUDIO DA CUNHA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: CLAUDIO DA CUNHA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), CAMILA PASQUINI DE SOUZA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), WILLIAM NORBEY SÁNCHEZ LUNA (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, CLAUDIO DA CUNHA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 13:56:56.0

CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:06:10.0

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:38:16.0

WILLIAM NORBEY SÁNCHEZ LUNA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NICOLAS CORDEIRO** intitulada: **ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 40 kHz DE FILHOTES DE RATOS E O EFEITO DA COCAÍNA EM VOCALIZAÇÕES DE 50 kHz EM RATOS ADULTOS**, sob orientação do Prof. Dr. CLAUDIO DA CUNHA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 13:56:56.0

CLAUDIO DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:06:10.0

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2023 11:38:16.0

WILLIAM NORBEY SÁNCHEZ LUNA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA)

RESUMO

Filhotes e ratos adultos emitem vocalizações ultrassônicas (USVs) que se acreditam estarem relacionadas a estados emocionais positivos e negativos. USVs de 40 kHz emitidos por filhotes separados de suas mães atraem a sua atenção e provavelmente são um índice de vínculo emocional entre eles. Ratos adultos emitem USV de 50 kHz em resposta a estímulos que provocam emoções relacionadas à recompensa. Isso inclui recompensas naturais, drogas estimulantes e estímulos preditivos de recompensa. Aqui, testamos se a USV de 40 kHz dos filhotes poderia prever seu estado emocional na idade adulta e/ou os efeitos estimulantes da cocaína. Ratos Wistar machos e fêmeas foram testados aos 11 dias de idade e posteriormente aos 89-100 dias de idade. Uma correlação positiva significativa foi observada entre os filhotes de USV e o tempo que os machos adultos passaram no braço aberto do labirinto em cruz elevado. No entanto, essa correlação não foi observada nas fêmeas. Em ratos adultos, a cocaína causou um aumento significativo no número de subtipos de USV de 50 kHz, *flat*, *step* e *trill*, mas não de USV de 50 kHz *mix*. Em ratas adultas, a cocaína aumentou significativamente as USVs de 50 kHz de todos os subtipos. Curiosamente, o número total de USVs de 50 kHz induzidas por cocaína em fêmeas testadas durante a fase não estral foi significativamente maior em comparação com as fêmeas que estavam na fase estral. A cocaína também causou um aumento significativo na atividade locomotora em machos e fêmeas. Nas fêmeas, esse efeito foi mais intenso naquelas em ciclo sem estro. No entanto, com exceção da correlação observada acima, nenhuma outra correlação significativa foi observada entre USVs de 40 kHz de filhotes e outros parâmetros comportamentais medidos em ratos adultos. Esses resultados sugerem que USVs de 40 kHz emitidas por filhotes são um índice representativo de um evento importante que ocorre na infância em ratos machos e que pode refletir no seu estado de ansiedade na idade adulta. No entanto, esse evento não está correlacionado com os efeitos agudos da cocaína avaliados durante a idade adulta.

Palavras-chave: cocaína; vocalização ultrassônica; filhotes de ratos; ciclo estral.

ABSTRACT

Pups and adult rats can emit ultrasonic vocalizations (USVs) that have been suggested to be associated with positive and negative emotional states. The 40 kHz USV emitted by pups separated from their mother evokes the mother's attention and may represent an emotional bond between mother and pup. Furthermore, adult rats emit 50 kHz calls in response to stimuli that evoke reward-related emotions. This includes natural rewards, stimuli, and reward-predicting stimuli. Here, we tested whether 40 kHz USV emitted by pups can predict emotional states and/or the stimulant effects of cocaine in adulthood. Male and female Wistar rats were tested at 11 days old and then at 89-100 days old. A positive and significant correlation was observed between the males, but not females, pup's 40 kHz USV and time spent in the open arms of the plus elevated maze during adulthood. In adult males, cocaine significantly increased the number of 50 kHz flat, step, and trill USV subtypes, but not mixed 50 kHz USV. In adult females, cocaine significantly increased 50 kHz USV for all subtypes. Interestingly, the total number of cocaine-induced 50-kHz USVs was significantly greater in females tested in non-estrus than in females that were in estrus. In females, this effect was stronger in subjects in non-estrus phase. However, apart from the correlations reported above, no significant correlation was observed between pup 40 kHz USVs and other behavioral parameters measured in during adulthood. These findings suggest that 40 kHz USV emitted by pups can be a marker of important events that occur during childhood in male rats, influencing anxiety states in adulthood. However, the 40 kHz USV emitted by pups was not correlated to the acute effects of cocaine evaluated during adulthood.

Key words: cocaine; ultrasonic vocalization; rat pups; estrous cycle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - NEUROBIOLOGIA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	17
FIGURA 2 - DESENHO EXPERIMENTAL.....	21
FIGURA 3 - VOCALIZAÇÕES DE 40 kHz EM FILHOTES.....	24
FIGURA 4 - EFEITO DA COCAÍNA EM USVS USV DE 50 kHz.....	26
FIGURA 5 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	27
FIGURA 6 - ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	28
FIGURA 7 - EFEITOS DO CICLO ESTRAL NOS ESCORES DE ANSIEDADE DO LCE, NÚMERO DE USVS EVOCADAS POR COCAÍNA E NA LOCOMOÇÃO EVOCADA POR COCAÍNA EM FÊMEAS ADULTAS.....	29
FIGURA 8 - CORRELAÇÕES ENTRE USVS DE 40 kHz EM FILHOTES E ESCORES DE ANSIEDADE EM ADULTOS.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITOS DA COCAÍNA NOS SUBTIPOS DE USVs.....	26
TABELA 2 - CORRELAÇÕES ENTRE USVs DE 40 kHz DE FILHOTES E USVs DE 50 kHz DE ADULTOS, LCE E ESCORES DE LOCOMOÇÃO.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	-	Serotonina
BA	-	Braços abertos
BF	-	Braços fechados
CEUA	-	Comitê de Ética local para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório
CID	-	Classificação internacional de doenças
CPL	-	Condicionamento de preferência de local
DA	-	Dopamina
DSM	-	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EI	-	Estímulo incondicionado
EPM	-	Erro padrão da média
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	-	Frequência modulada
HYP	-	Hipotálamo
LC	-	<i>Locus coeruleus</i>
LCE	-	Labirinto em cruz elevado
LT	-	Núcleo tegmental látero-dorsal
NAc	-	Núcleo accumbens
NE	-	Noradrenalina
NIDA	-	<i>National Institute on Drugs of Abuse</i>
PS	-	Preferência à sacarose
RMN	-	Ressonância magnética nuclear
SE	-	Septo lateral
SNc	-	Substância negra parte compacta
SNC	-	Sistema nervoso central
TDAH	-	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TUC	-	Transtorno por uso de cocaína
TUS	-	Transtorno por uso de substâncias
USV	-	Vocalização ultrassônica (do inglês <i>ultrasonic vocalization</i>)
VTA	-	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	PSICOESTIMULANTES E EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DE COCAÍNA	10
1.2	TRANSTORNO POR USO DE SUBSTÂNCIAS.....	10
1.3	MODELOS ANIMAIS DOS TUS E TUC.....	12
1.4	TUC E TUS: DIFERENÇA ENTRE OS SEXOS.....	13
1.5	COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO.....	14
1.6	VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	15
1.7	NEUROBIOLOGIA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS.....	16
1.8	VOCALIZAÇÃO EM FILHOTES DE RATO.....	17
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	ANIMAIS.....	20
3.2	DROGAS E GRUPOS DE TESTE.....	21
3.3	GRAVAÇÃO USV E ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	21
3.4	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DURANTE A IDADE ADULTA	22
3.5	DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	23
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4	RESULTADOS.....	24
4.1	REGISTRO DAS USV DE 40kHz EM FILHOTES.....	24
4.2	REGISTRO DE USVs DE 50kHz EM RATOS ADULTOS.....	24
4.3	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	27
4.4	ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	28
4.5	INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL DE RATAS ADULTAS NOS ESCORES DO LCE, ATIVIDADE LOCOMOTORA EVOCADA POR COCAÍNA E NO NÚMERO DE USVs DE 50 kHz EVOCADAS POR COCAÍNA.....	28
4.6	CORRELAÇÕES ENTRE AS USVs DE 40 kHz REGISTRADAS ENQUANTO OS ANIMAIS ERAM FILHOTES E AS USVs DE 50 kHz E ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DO DO LCE E DA ATIVIDADE LOCOMOTORA REGISTRADAS QUANDO OS ANIMAIS JÁ ERAM ADULTOS.....	30

5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 PSICOESTIMULANTES E EPIDEMIOLOGIA DO CONSUMO DE COCAÍNA

Os psicoestimulantes são substâncias químicas capazes de alterar o estado normal de um indivíduo gerando um estado de ativação comportamental, modulando principalmente a neurotransmissão de catecolaminas. As anfetaminas e a cocaína são as drogas estimulantes de abuso mais consumidas mundialmente (CORDEIRO; PINTO, 2017; JOHNSON *et al.*, 2018). Podem apresentar efeitos adversos como taquicardia, alterações de humor, perda de apetite, agitação e agressividade. Além disso, são capazes de conferir uma rápida dependência em seus usuários (SORDO *et al.*, 2013; MAJORI *et al.*, 2017; FARRELL *et al.*, 2019).

A cocaína é extraída das folhas da planta *Erythroxylum coca* e consumida frequentemente na forma de cloridrato, aspirada de forma nasal ou injetada de forma intra-venosa. Outras apresentações dessa droga incluem o crack que é a cocaína na forma de base, insolúvel em água. Por ser volátil quando aquecido, o crack pode ser consumido por usuários em cachimbos e se apresenta como uma opção mais barata que a cocaína (ARAUJO; LARANJEIRA; DUNN, 1988; FERREIRA; MARTINI, 2001; DUAİLÍBI; RIBEIRO; LARANJEIRA, 2008).

Originalmente a *Erythroxylum coca* era consumida por povos Andinos e se tornou conhecida na América do Norte e Europa em meados do século XIX. Encontrada na forma de diversas bebidas, ela era conhecida pelo potencial medicinal, mas também observou-se o princípio do seu consumo com o intuito recreativo, tendo seu uso proibido a partir dos anos 20 por apresentar diversos problemas a saúde (LA PARRA, 1989; KARCH, 1999; SANIOTIS *et al.*, 2014).

Contudo, entre os anos 70 e 80 seu consumo novamente se popularizou acompanhando o crescimento de grandes centros urbanos e a necessidade do aprimoramento da produção de trabalho. Com a necessidade de produzir mais no trabalho e dadas as circunstâncias da época, uma droga estimulante como a cocaína era de certo modo um grande benefício (KARCH, 1999).

1.2 TRANSTORNO POR USO DE SUBSTÂNCIAS

O NIDA (*National Institute on Drugs of Abuse*) conceitua o transtorno por uso de substâncias pelo uso compulsivo de uma droga apesar dos efeitos deletérios, tanto para a saúde do indivíduo como para com o seu ciclo social. As obrigações pessoais acabam ficando em segundo plano e a parada abrupta do uso de tal substância pode vir a causar uma grave abstinência (NIDA, 2018). De forma comum, a adicção se instala após longos períodos de consumo, que evolui de práticas de consumo recreativas para o consumo rotineiro (KATZUNG, 2017).

Segundo o Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais DSM V (APA, 2013) não há a diferenciação entre os termos adicção e dependência, ficando o termo transtorno por uso de substâncias (TUS) como definição para o uso crônico de fármacos e ou drogas que causam consequências psicológicas, físicas e, principalmente, sociais ao indivíduo. O TUS pode ser categorizado em três estágios: 1º: o estágio inicial, onde pode ocorrer o uso excessivo ocasional; 2º: quando a droga é removida sem que possa surgir o efeito de abstinência e 3º: o efeito de antecipação ao uso, que pode ser reconhecido como fissura – uma vontade incontável de consumir a droga, mesmo que o seu uso possa causar efeitos deletérios, sejam ele fisiológicos ou sociais (KOOB; VOLKOW, 2010).

O CID-10 (classificação internacional de doenças) e o DSM V definem um conjunto de critérios relacionados ao comportamento e itens para o diagnóstico da TUS: o descontrole e a dificuldade de se abster da substância, a parada abrupta nas atividades sociais, a tolerância que conduz ao uso de doses cada vez mais altas, o que é necessário para se obter o efeito e, por fim, a abstinência, que é apenas cessada com o consumo da droga (APA, 2013). A TUS se instala ao longo do tempo, permeado por períodos intensos e constantes de uso. Essa tendência de consumo evolui para o uso indevido e de maneira socialmente não aprovada (KATZUNG, 2017).

O uso abusivo de cocaína implica em um grande problema em função das consequências do seu consumo. Vão desde prejuízos na saúde mental e física do usuário, até transtornos sócio-ocupacionais, econômicos e legais, que envolvem outras instâncias para além das individuais (ANTHONY, 2010; WEI; ANTHONY; LU, 2012).

O transtorno por uso de cocaína (TUC) é um grande problema de saúde pública e uma doença crônica para o qual ainda não há tratamento efetivo e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (CHAN *et al.*, 2019; FARRELL *et al.*, 2019). Em 2021, cerca de 36 milhões de pessoas sofreram por transtornos no uso de

substâncias, sendo uma grande parcela delas com os efeitos deletérios da cocaína (UNODC, 2021). O uso compulsivo implica em diversos prejuízos. Os que diretamente afetam a saúde do usuário e os que interferem em fatores econômicos e sociais, que se entrelaçam para além das consequências individuais (ANTHONY, 2010; WEI; ANTHONY; LU, 2012).

1.3 MODELOS ANIMAIS DOS TUS E TUC

Em modelos animais, o método mais usado e que mais se assemelha ao padrão de uso em humanos é o de autoadministração. Esse método, conhecido como condicionamento operante, teoria proposta por Burrhus Frederic Skinner, consiste da premissa que um indivíduo tem a capacidade de associar um comportamento a uma subsequente consequência (SKINNER, 1938). Por tanto, quando a consequência de uma ação é um estímulo recompensador e reforçador, o mesmo sofre a tendência de ser repetido.

Ao contrário, estímulos aversivos (reforçador negativo), tendem a ser evitados. O comportamento do animal em um modelo de dependência, em certos pontos, assemelha-se ao comportamento humano. Apesar de sofrer a exposição a um reforço negativo, ou até mesmo a uma punição, o animal tende a exercer a função de buscar a droga. Caso se exija um esforço maior de respostas, os animais aumentam o número da quantidade exigida (ROBINSON, 2004).

Nesse modelo, o experimentador consegue identificar o reforço dispensado para a obtenção da substância, tal como o seu e o potencial de abusivo. Neste modelo, através dos efeitos reforçadores positivos, o animal é condicionado a pressionar uma alavanca e obter a droga. Nesse sentido, a resposta para com a pressão da alavanca pode ser analisada, inclusive quando são administradas substâncias inertes (KOOB; VOLKOW, 2010).

O experimentador ainda pode observar a adicção no modelo animal através do condicionamento de preferência de local (CPL). Baseado no condicionamento Pavloviano, esse método consiste no pareamento de um local, caixa atividade e afins de duas maneiras distintas. Em um local o animal de experimentação receberá o estímulo recompensante como a droga e exposto ao estímulo condicionado (EC). Identificado com uma configuração espacial e decorativa própria, logo o animal

reconhece esse local como onde receberá a recompensa. Já em outro ambiente, o mesmo não o receberá (BARDO; HORTON; YATES, 2015).

O animal que é repetidamente exposto ao EC irá associar o ambiente e suas características com os efeitos reforçadores durante a sessão de condicionamento (HUSTON *et al.*, 2013; BARDO; HORTON; YATES, 2015; CARTER; SHIEH, 2015). A resposta condicionada, ou seja, a busca pelo ambiente relacionado à droga, sinaliza que houve realmente uma conexão entre os dois estímulos. Isso significa que o animal atribui importância ao contexto do ambiente

1.4 TUC E TUS: DIFERENÇA ENTRE OS SEXOS

O TUS é um transtorno debilitante que atinge ambos os sexos, sendo predominantemente maior entre homens (cerca de 70%). No entanto, as mulheres podem vir a apresentar maiores níveis de TUS ou TUC com mais facilidade e encontrar maiores dificuldades em permanecer um maior tempo de abstinência em comparação com homens. Embora essas diferenças sexuais possam levar em consideração fatores sociais ou culturais, em modelos animais, observa-se uma diferença semelhante (BECKER; KOOB, 2016; UNODC, 2021).

Em humanos, tanto as respostas cardiovasculares quanto subjetivas à cocaína foram reduzidas durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando os níveis de estrogênio estão diminuindo. Por outro lado, durante a fase folicular, quando os níveis de estrogênio estão elevando-se, mulheres relataram um maior desejo do consumo de cocaína, sugerindo uma ligação potencial entre os hormônios ovarianos circulantes e a busca por cocaína (CALIPARI *et al.*, 2017).

Embora o ciclo menstrual não tenha sido definitivamente associado a esse processo em humanos, esses relatos, no entanto, levantam a possibilidade de mecanismos sexualmente dimórficos de processamento de recompensa e sugerem que os efeitos do ciclo menstrual/estral podem estar envolvidos. Em modelos animais, o aumento da potência da cocaína no DAT é altamente correlacionado com o estradiol, mas não com os níveis de progesterona, reforçando assim o papel destas variações hormonais nos efeitos da cocaína e possivelmente também no efeito de outras drogas de abuso (CALIPARI *et al.*, 2017).

1.5 COCAÍNA COMO DROGA DE ABUSO

Na década de 60, influenciados pelo conceito behaviorista introduzido por Burrhus Frederic Skinner (SKINNER, 1953), diversas pesquisas demonstraram que em animais, as drogas de abuso poderiam atuar como agentes reforçadores da mesma maneira que água e comida. Com isso, uma nova abordagem em relação aos mecanismos neuronais da adicção se estabeleceram e evidenciaram o papel crucial da sinalização dopaminérgica em ações reforçadoras (PICKENS; THOMPSON, 1968). Embora tenham distintos mecanismos de ação, drogas de abuso como a nicotina, cocaína e anfetaminas, por exemplo, compartilham o mesmo efeito potencializador da transmissão dopaminérgica no núcleo acumbens (WISE, 1988).

Funções orgânicas como o movimento e cognitivas como a motivação, aprendizado e memória apresentam como denominador comum a dopamina (CUNHA; GOMEZ-A; BLAHA, 2012). A sinalização dopaminérgica é essencial em diversos mecanismos fisiológicos e quando em concentrações alteradas, é responsável por diversas complicações de saúde como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), doença de Parkinson, esquizofrenia e o abuso de drogas (LENT, 1994; JUAREZ; HAN, 2016).

A cocaína é uma droga estimulante do sistema nervoso central (SNC) e sua administração resulta no aumento extracelular de dopamina (DA), noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT) (FRAZER; RICHARDS; KEITH, 2018). Como a maioria das drogas que causam dependência, a ativação da via mesolímbica de recompensa, existe um reforço de comportamentos de busca e autoadministração de cocaína. Esta conduta é observada em humanos e roedores, sendo os responsáveis os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) com projeções para o núcleo accumbens (NAc) (DI CHIARA; IMPERATO, 1988; IKEMOTO, 2007; VOLKOW; KOOB; McLELLAN, 2016).

As alterações mais relevantes de sua ação estão ligadas a sinalização dopaminérgica no centro de recompensa mesolímbico do SNC (HOWELL; CUNNINGHAM, 2015; HITNER; NAGLE, 2016). O principal centro de processamento de informações relacionados a recompensas e comportamento motivado é representado pela via mesolímbica, envolvendo principalmente os neurônios dopaminérgicos na VTA e a projeção axonal destes ao NAc (PIERCE; KUMARESAN, 2006; SOUZA; DUNNINGHAM; SENA, 2018).

1.6 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

Em todas as espécies, os animais podem se comunicar através de estímulos elétricos, visuais e principalmente, auditivos. O som apresenta a vantagem de permitir a comunicação à distância e, os roedores, podem se comunicar através de vocalizações ultrassônicas (USV) (SOHN, S. *et al.*, 2022).

As USVs de ratos não podem ser comparadas à fala humana, visto que os roedores não possuem os mecanismos neurais necessários e o cérebro cognitivo desenvolvido para ter essa forma de comunicação. No entanto, as USVs podem ser comparadas às vocalizações humanas (BRUDZYNSKI, 2015).

Esta é uma comparação válida porque as vocalizações não-verbais humanas (como chorar, rir, grunhir, gemer ou gritar) não têm conteúdo lexical. Além disso, elas são geradas por mecanismos límbicos subcorticais e são equivalentes evolutivos de outras vocalizações de mamíferos (por exemplo, traços humanos não-verbais, bem como traços patológicos) (BURGDORF; PANKSEPP, 2006).

Há necessidade de um melhor entendimento da origem, natureza e papel das vocalizações ultrassônicas em ratos, seus mecanismos de iniciação, sua interpretação e sua equivalência com as emissões vocais humanas. As USVs são emitidas por ratos e fazem parte da comunicação na vida social. Por serem sons ultrassônicos, acima de 20 kHz, não são audíveis aos ouvidos humanos (WÖHR; SCHWARTING, 2013; WÖHR, 2018).

Uma das funções mais conhecidas das UVS é a de alarme. O despertar desse padrão de vocalização evoluiu como um comportamento de sobrevivência pois avisa ao grupo do perigo eminente de um predador. Aquelas emitidas nas faixas de 22 kHz, são USVs de duração longa e frequência não-modulada (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989, 1990; BLANCHARD *et al.*, 1990).

Em ratos adultos, dois padrões de vocalização são identificados: o de caráter aversivo, representado pela USVs de 22 kHz e o positivo, que corresponde as USVS de 50 kHz (BRUDZYNSKI, 2007; 2009; 2013).

A emissão de USVs de 22 kHz identifica estados emocionais negativos que podem ser atribuídos a sintomas disfóricos, ansiedade, medo, dor, eminência de predadores ou expectativa de punição. São USVs de longa duração com frequência não-modulada e emitidas em um tempo prolongado. Dessa forma, as respostas

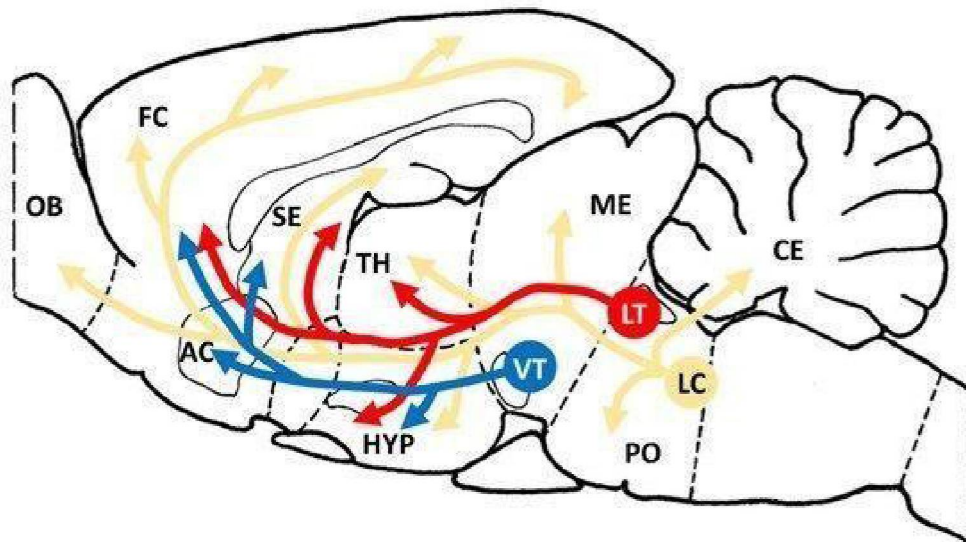
comportamentais às vocalizações de 22 kHz em ratos sem tratamento medicamentoso ou comportamental resultaram em diminuição da atividade locomotora, aumento da inibição comportamental e resposta de congelamento (BRUDZYNSKI, 2015).

Já as USVs de 50 kHz, que são consideradas como de caráter apetitivo, são emitidas por roedores em situações de interação social, alimentação, brincadeiras e sexo. Além disso, a emissão de USVs de 50 kHz pode ser induzida farmacologicamente por administração de cocaína sistêmica ou diretamente no núcleo *accumbens*. Já em períodos de abstinência USVS aversivas (22 kHz) são observadas (BARKER; SIMMONS; WEST, 2015; RIPPBERGER *et al.*, 2015).

1.7 NEUROBIOLOGIA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

As USVs de 22 kHz são iniciadas pelo sistema colinérgico mesolímbico ascendente e vocalizações de 50 kHz, pelo sistema dopaminérgico mesolímbico ascendente. Em contraste com o sistema de excitação cognitiva, esses dois sistemas de excitação emocional têm como alvo principalmente as regiões subcorticais e límbicas (FIGURA 1). Essa diferenciação na inervação mesolímbica evoluiu como uma extensão da mesma diferença que ocorre no sistema nervoso autônomo, formando uma divisão simpático-parassimpática. Os dois sistemas de excitação emocional mesolímbicos têm funções distintas e antagônicas, permitindo que os animais vivenciem dois efeitos distintos e comportamentos opostos, ou seja, perigo em situações aversivas (estado negativo) e prazer (positivo) em situações apetitosas (BRUDZYNSKI, 2021).

FIGURA 1 - NEUROBIOLOGIA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS



FONTE: Brudzynski, 2021.

NOTA: O diagrama apresenta um esboço e uma relação entre o sistema de excitação cognitiva ascendente e dois sistemas de excitação emocional no cérebro do rato. O sistema de excitação cognitiva (setas amarelas) origina-se do locus *coeruleus* (LC), libera norepinefrina e atinge a maior parte do cérebro, mas particularmente o neocórtex. O sistema de excitação emocional aversiva mesolímbica (setas vermelhas) se origina do núcleo tegmental látero-dorsal (LT) e tem como alvo extensas regiões límbicas através do hipotálamo (HYP) até o septo lateral (SE) e libera acetilcolina. O sistema de excitação emocional apetitiva mesolímbica (setas azuis) se origina da área tegmental ventral (VT) e tem como alvo predominante o núcleo accumbens (AC) e regiões vizinhas e libera dopamina. Ambos os sistemas de excitação mesolímbico provavelmente também estão atingindo o córtex frontal (FC). O diagrama mostra apenas as partes essenciais desses dois sistemas de excitação emocional, que representam fragmentos funcionais relevantes de todos os neurônios colinérgicos e dopaminérgicos no cérebro. À primeira vista, fica claro que os sistemas de excitação emocional ascendentes têm como alvo regiões límbicas predominantemente subcorticais. Outras abreviações: CE – cerebelo, ME – mesencéfalo, OB – bulbo olfatório, PO – ponte, TH – tálamo.

1.8 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS EM FILHOTES DE RATOS

Além dos cuidados maternos e da relação paternal no início da vida, a relação mãe-filhote desenvolveu outra característica: a vocalização ultrassônica infantil (MALINOWSKI, 1993). A emissão de USVs ultrassônicas evoluíram, mas sua função primária permaneceu a mesma: a de localização e proteção da espécie. Os chamados de alerta infantil são de suma importância para garantir a sobrevivência e, o direcionamento materno permanece com a mais remota forma de comunicação (MACLEAN, 1958; NAUTA, 1972).

Emitidas em uma frequência média de 40 kHz, são direcionadas à mãe sempre quando o neonato é separado da ninhada, em mudanças bruscas de temperatura ou cuidados maternos agressivos. Também emitida para estabelecer e manter laços sociais, as USVs infantis visam manter uma ligação afetiva adaptativa

entre a espécie, uma intimidade tranquilizadora e a coesão entre os animais. As vocalizações produzidas por filhotes são denominadas USVs de alerta (SHAHRIER; WADA, 2021).

Elas se iniciam desde o nascimento até o momento do desmame, que ocorre aproximadamente aos 21 dias. Filhotes com USV próximos da faixa e 40 kHz teriam semelhanças com as aversivas em adultos, enquanto os de faixa entre 66 kHz com as apetitivas (BOULANGER-BERTOLUS *et al.*, 2017). Além disso, taxas extensas de USV na infância mediadas por isolamento podem ser determinantes fatores para ansiedade e depressão na idade adulta (BRUNELLI *et al.*, 2015).

A importância da comunicação vocal em filhotes de ratos sugere que os filhotes com menos ajuda materna do que o habitual, ficam assustados e emitem mais vocalizações ultrassônicas do que os controles quando separados de suas mães e irmãos (WÖHR; SCHWARTING, 2008). Além disso, experimentos que mimetizam a exposição a situações estressantes dos filhotes por cerca de 30 minutos diários, aumentaram as USVs de isolamento em comparação com filhotes recebendo cuidados maternos esperados, sugerindo que este procedimento melhorou os resultados de desenvolvimento de ratos que sofreram abusos maternos (BRUDZYNSKI, 2021).

Filhotes sempre prestam atenção à mãe e à proximidade dela. A interação do filhote com sua mãe logo antes do isolamento do filhote mostrou aumentar ainda mais as vocalizações do filhote para o isolamento subsequente (denominado realce materno). Concluiu-se que as USVs emitidas da primeira infância podem representar níveis de ansiedade durante esta fase e que essas USVs podem ser reduzidas farmacologicamente por muitos ansiolíticos (BRUDZYNSKI, 2021).

As vocalizações de 40kHz expressam a emocionalidade dos filhotes, portanto, a análise dessas USVs e sua relação materna pode ser um valioso índice para se avaliar o comportamento do tipo ansioso e a relação ao uso agudo de cocaína na idade adulta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível correlação entre as USVs espontâneas de 40kHz emitidas na infância com os parâmetros relacionados a comportamentos de ansiedade na idade adulta, e também com a emissão de USVs de 50kHz e os efeitos da administração de cocaína sobre estas durante a idade adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a correlação entre vocalizações infantis de 40kHz e parâmetros de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) de ratos adultos.
- Testar a correlação entre USVs de 40kHz e USVs de 50kHz em ratos adultos.
- Testar a correlação entre os índices de ansiedade coletados no LCE e USVs de USVs de 50 kHz evocados por cocaína.
- Testar a correlação entre os índices de ansiedade coletados no LCE e efeitos da administração de cocaína sobre a atividade locomotora.
- Testar se existem diferenças comportamentais entre machos e fêmeas e entre fêmeas durante o período de estro e sem estro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

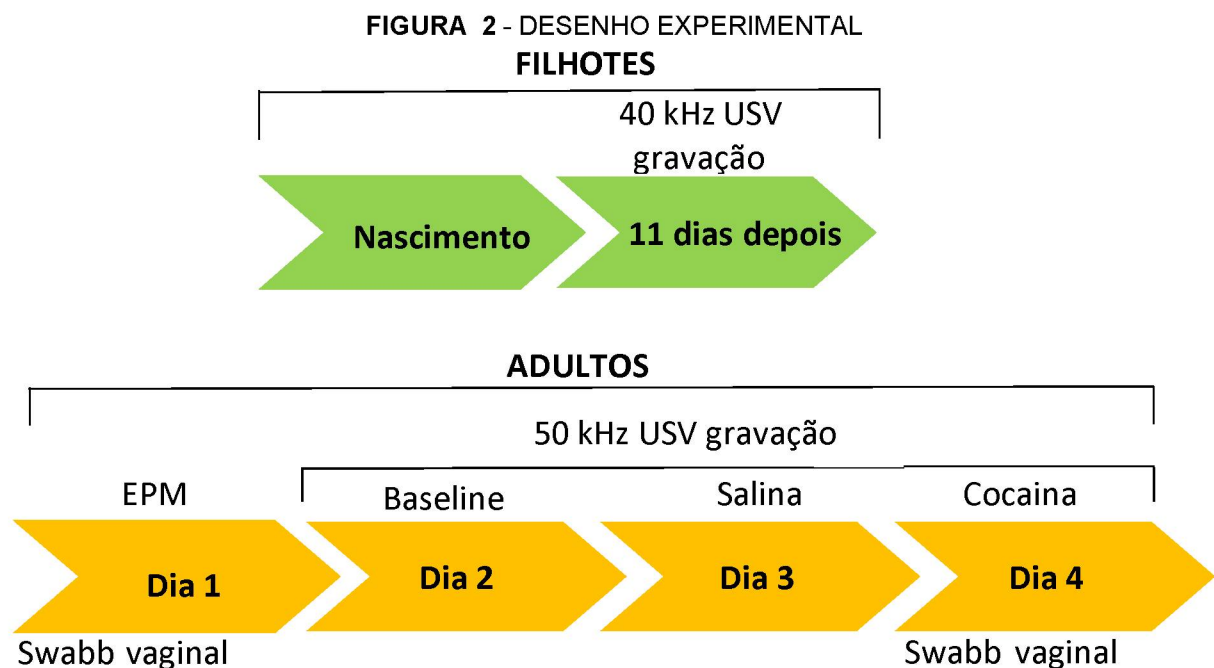
3.1 ANIMAIS

Doze ratos *Wistar* adultos (machos, n = 6 e fêmeas, n = 6) foram utilizados para os procedimentos de acasalamento. Quarenta e sete filhotes (machos, n = 22 e fêmeas, n = 25) foram obtidos após o acasalamento e utilizados durante experimentos comportamentais. Os filhotes foram identificados através da marcação em suas caudas permanecendo esse o critério de identificação até a finalização de todos os experimentos. O desmame ocorreu aos 21 dias de idade sendo os mesmos separados conforme o sexo e acondicionados com no máximo 4 animais por caixa-moradia. Durante os procedimentos de acasalamento, mães e machos foram colocados juntos em gaiolas padrão de polipropileno (41 × 34 × 16 cm) com cama de maravalha e essa, trocada em dias alternados. Os casais foram mantidos juntos desde o acasalamento até o desmame da prole. Nenhuma exposição à droga foi realizada nesse momento do experimento. Os filhotes foram desmamados no 21º dia pós-natal (PN). Após esse procedimento, os filhotes machos e fêmeas foram separados por sexo e mantidos em grupos de até quatro em gaiolas padrão de polipropileno com cama de maravalha.

Todos os animais utilizados neste estudo foram mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h00) e temperatura controlada (22 ± 2 °C). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*. Os experimentos seguiram os princípios de cuidados com animais de laboratório e foram conduzidos de acordo com as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Mamíferos em Neurociência e Pesquisa Comportamental. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as legislações brasileira (Lei 11.794/8 de outubro de 2008) e europeia (86/609/EEC). O protocolo experimental foi aprovado pelo Conselho de Ética Institucional (protocolo CEUA-UFPR nº 1004). Além disso, o uso de ratos machos e fêmeas neste estudo visa seguir as diretrizes ARRIVE (pesquisa com animais: relato de experimentos in vivo) para reprodutibilidade experimental (DU SERT *et al.*, 2020). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

3.2 DROGAS E GRUPOS DE TESTE

A cocaína HCl foi fornecida pela Polícia Federal (consulta de doação nº 5016610 91.2019.4.04.7000/PR). A cocaína HCl foi analisada em espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e foi determinada com 98% de pureza. A cocaína HCl foi dissolvida em solução salina (0,9% p/v) a 20 mg/mL. O fármaco e o veículo foram administrados via injeção i.p. A FIGURA 2 esquematiza o desenho experimental utilizado no desenvolvimento dos experimentos.



FONTE: O autor (2023).

NOTA: A prole de 6 ratas foi utilizada (n = 47). As vocalizações ultrassônicas registradas de ratos machos e fêmeas aconteceram quando os filhotes estavam com 11 dias de idade e quando eram adultos. Quando os mesmos ratos eram adultos (dia 1, 89-100 dias após o nascimento), foram testados em um labirinto em cruz elevado (LCE). No dia seguinte (dia 2), as USVs foram registradas em condições basais (sem tratamento, dia 2). Nos dias 3 e 4, USVs foram registradas imediatamente após os ratos receberem tratamento, ou seja, solução salina e 20 mg/kg de cocaína, respectivamente. Nos dias 1 e 4, imediatamente após a sessão de teste, um swab vaginal foi coletado e analisado para determinar a fase do ciclo estral.

3.3 GRAVAÇÃO USV E ATIVIDADE LOCOMOTORA

Quando os filhotes completaram 11 dias, as USVs foram registradas em uma única sessão de 5 minutos. Para este procedimento, um microfone (*UltraSoundGate Condenser Microphone*, CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) controlado pelo software Avisoft Recorder 2.7 foi colocado a 45 cm acima do centro de uma caixa de acrílico customizada para gravações de USVs infantis (40x40x40 cm), contendo

maravalha fresca no fundo da caixa e os animais foram mantidos em temperatura ambiente controlada a 22 °C. Para diminuir o estresse materno induzido pela manipulação e separação dos filhotes, foi aplicado um intervalo de 5 minutos entre cada retirada e os mesmos foram retirados de forma aleatória da gaiola. Após as gravações dos USVs, nenhum experimento adicional foi realizado com esses descendentes até a idade adulta.

Durante a fase adulta, PD 91, USVs foram registradas nesses mesmos animais em três sessões: baseline (sem administração de drogas), veículo (solução salina 0,9%, i.p.) e cocaína (20 mg/kg, i.p.). Cada sessão teve duração de 40 minutos e foram realizadas com 24 horas de intervalo. O veículo e a cocaína foram administrados imediatamente antes do início da sessão. Em cada sessão, os procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente (SANCHEZ *et al.*, 2021). Os ratos foram cuidadosamente colocados em uma caixa de acrílico (40 x 40 x 40 cm) com maravalha fresca no fundo, a temperatura do ambiente foi monitorada bem como a luz. As USVs foram gravadas com um microfone (*UltraSoundGate Condenser Microphone*, CM16; Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) colocado 25 cm acima do centro da caixa, controlado pelo software Avisoft Recorder 2.7. Simultaneamente às gravações das USVs, a atividade locomotora foi registrada por uma câmera suspensa (sistema de rastreamento comportamental ANY-maze®, Stoelting Co., IL). Tanto as USV de 50 kHz quanto as de 40 kHz foram contadas automaticamente usando o software *DeepSqueak* 2.6.1 (COFFEY; MARX; NEUMAIER, 2019), aceitas (ou rejeitadas) manualmente. A USVs de 50 kHz foram classificadas em quatro subtipos de acordo com Pereira *et al.* (2014), *Flat*, *Step*, *Trill* ou *Mix*. A atividade locomotora foi analisada pelo software automatizado EthoVision® XT (Noldus, Wageningen, Holanda).

3.4 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DURANTE A IDADE ADULTA

No PD 90, os ratos foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação do comportamento do tipo ansioso. Para esse procedimento, os ratos foram colocados em um LCE de madeira, pintado de preto e elevado 50 cm acima do piso. O LCE continha dois braços abertos de 50x10 cm e dois braços fechados de 50x10 cm (paredes de 50 cm de altura). Ambos os braços abertos e fechados foram alinhados perpendicularmente e conectados por um centro de labirinto

de 10x10 cm. O teste teve duração de 5 minutos em que os ratos puderam explorar livremente o labirinto. As sessões foram gravadas por uma câmera suspensa (ANY-maze® Behavioral tracking system, Stoelting Co., IL). As análises comportamentais foram realizadas com o software EthoVision® XT (Noldus, Wageningen, Holanda). Durante a análise comportamental foram analisados os seguintes comportamentos: número total de entradas nos braços abertos e fechados e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e fechados, número total de *risk assessment* (posição do corpo alongado do centro do labirinto em direção a entrada do braço aberto), *head dippings* e entradas na porção final (últimos 3 cm) do braço aberto.

3.5 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Amostras de swabs vaginais foram coletadas após o teste de LCE e após a última sessão de registro de USVs (sessão de administração de cocaína). Essas amostras foram utilizadas para a determinação do ciclo estral das ratas. Para esse procedimento, uma micropipeta com ponta de polietileno foi introduzida suavemente no canal vaginal e 0,3 mL de solução salina foi injetado e prontamente aspirado. A amostra coletada foi colocada em uma lâmina de vidro e avaliada a fresco ao microscópio (Leica, Alemanha). A classificação do ciclo estral foi realizada conforme descrito anteriormente (BENMANSOUR *et al.*, 2009).

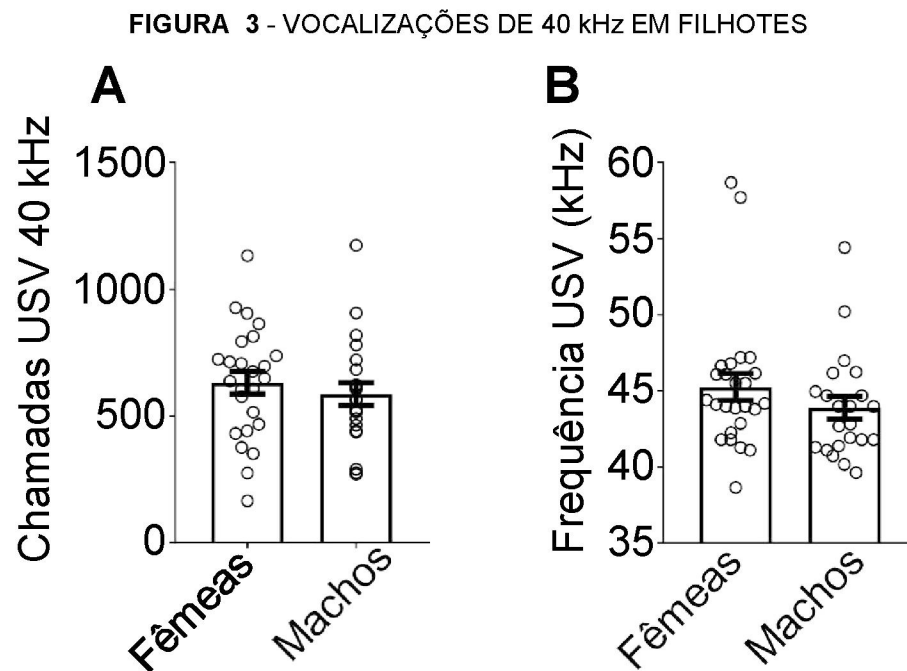
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados através do software GraphPad Prism 8.0.1. Distribuição normal e desvios padrão significativamente diferentes foram avaliados com o teste de Komogorv-Smirnov e o teste de Bartlett, respectivamente. Os conjuntos de dados que não passaram no teste de distribuição normal foram transformados em log (Y+2). O conjunto de dados que passou nesses testes foi analisado pelo teste t de Student ou ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA) seguido pelo teste de Sidak. Os dados que não passaram em um desses testes foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis ANOVA seguido do teste de Dunn. Análises de correlação foram realizadas por meio do teste de correlação de Pearson. As diferenças ou correlações entre os grupos foram consideradas significantes se $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 REGISTRO DAS USV DE 40kHz EM FILHOTES

O número de vocalizações de 40 kHz e diferentes frequências em filhotes machos e fêmeas são mostrados na FIGURA 3A e 3B, respectivamente. Os dados da FIGURA 3A passaram nos testes de normalidade e desvio padrão e foram analisados por um teste T não pareado que não detectou diferença significativa entre machos e fêmeas ($p = 0.48$). A FIGURA 3B não passou no teste de normalidade e foi analisada pelo teste de Mann-Whitney, que não detectou diferença significativa entre machos e fêmeas ($U = 214$, $P = 0.19$, $P = 0.20$).



Fonte: O autor (2023).

LEGENDA: A. Número de USVs. B. Frequências de chamada. As barras representam a média \pm SEM. O teste t de Student (A) e o teste de Mann-Whitney (B) não detectaram diferenças significativas entre os grupos. Fêmeas (N=25), machos (N = 22).

4.2 REGISTRO DE USVs DE 50kHz EM RATOS ADULTOS

O número total de USVs de 50 kHz é mostrado na FIGURA 4A. Os dados foram transformados em $\log(y+2)$ e analisados por RM-ANOVA. Esta análise não mostrou um efeito significativo de sexo ($F(1,45) = 0.03$, $P = 0.88$), mostrou um efeito significativo do fator sessão (tratamento), $F(2,90) = 52.18$, $P < 0.001$ e uma interação

significante entre os fatores sessão e sexo ($F(2,90) = 3.75$, $P = 0.02$). Os testes post-hoc de Sidak detectaram em machos e fêmeas um aumento significativo no número de USVs após a administração de cocaína em comparação com os dias em que os ratos receberam solução salina e em comparação com a sessão de *baseline* ($P < 0.001$). Nenhuma diferença significativa entre machos e fêmeas nas condições de *baseline*, solução salina e cocaína foi encontrada ($P = 0.34$, teste de Sidak).

As USVs de 50 kHz foram classificadas em 4 subtipos: *flat*, *step*, *trill* e *mix*. O número de cada subtipo de USVs em um dia foi comparado com o número registrado em outro dia pelo teste qui-quadrado, e está representado na forma de percentual na FIGURA 4B). Em geral, o estresse causado pela injeção de salina (dia 2) e pelo tratamento com cocaína (dia 3) diminuiu a quantidade de USVs moduladas (*step*, *trill* e *mix*) e aumentou a proporção da classe não-modulada (*flat*). Mais especificamente, nos machos, a injeção de solução salina causou uma diminuição significativa na proporção de USVs do tipo *trill* ($P < 0.001$) e *mix* ($P = 0.02$), em comparação com o dia *baseline*. Nas fêmeas, a proporção de USVs do tipo *step* ($P < 0.01$) e *mix* ($P < 0.001$) diminuiu e a proporção de *flat* aumentou ($P < 0.001$) na sessão de exposição a salina em comparação com a sessão de *baseline*. Por outro lado, no dia da injeção de cocaína, a proporção de USVs *step*, *trill* e *mix* aumentou e a proporção de chamados *flat* diminuiu em comparação com o dia *baseline* e com o dia em que os animais receberam a injeção de solução salina, tanto em machos como em fêmeas ($P < 0.001$).

Embora a proporção de USVs moduladas e não-moduladas tenham se alterado em direções opostas com o tratamento com solução salina e cocaína, de maneira geral, o número absoluto de USVs não se alterou com o tratamento com solução salina. Além disso, o número de USVs moduladas e não-moduladas aumentou com o tratamento com cocaína (FIGURA 4C). Esses dados não passaram no teste de normalidade mesmo após as transformações $\log(y)$ e $\log(y+2)$. Então, esses dados foram analisados por Kruskal-Wallis ANOVA (TABELA 1) seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (FIGURA 4C). Nos machos, a cocaína causou um aumento significativo no número de USVs dos tipos *flat*, *step* e *trill* em comparação com a sessão de *baseline* ($P < 0.05$). Ratos machos também emitiram significativamente mais USVs *step* e *trill* no dia em que receberam cocaína do que no dia em que receberam solução salina ($P < 0.05$). Nas fêmeas, no dia do tratamento

com cocaína causou um aumento significativo no número de USVs de todos os tipos em comparação com o dia da injeção de solução salina e com o dia *baseline* ($P < 0.05$).

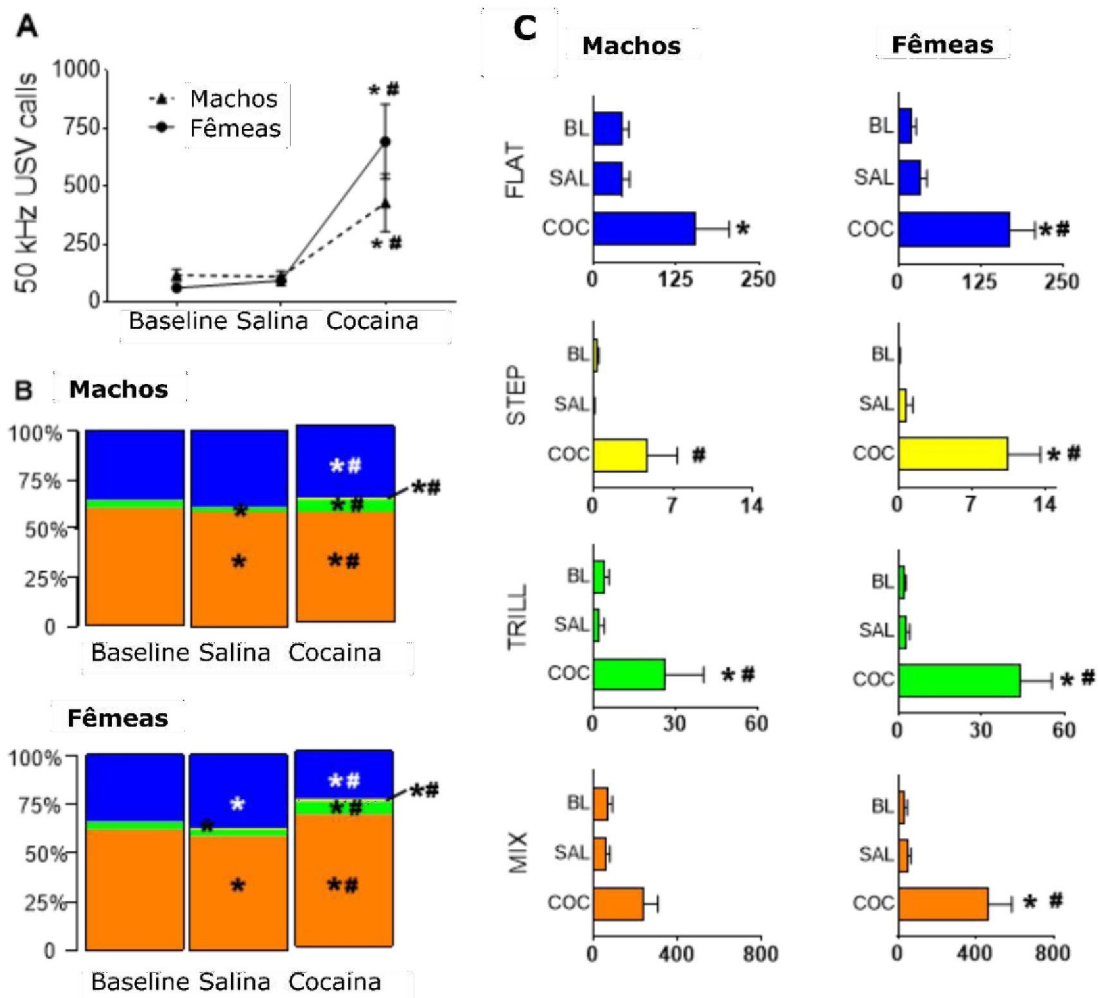
TABELA 1 - EFEITOS DA COCAÍNA NOS SUBTIPOS DE USVs

	MACHOS		FÊMEAS	
	KW	P	KW	P
<i>FLAT</i>	4,59	0,10	20,89	< 0,05
<i>STEP</i>	8,31	0,01	21,77	< 0,05
<i>TRILL</i>	19,49	< 0,05	17,98	< 0,05
<i>MIX</i>	5,59	0,06	26,77	< 0,05

FONTE: O autor (2023).

NOTA: Estatísticas dos dados mostrados na FIGURA 4D. Dados analisados por Kruskal-Wallis ANOVA.

FIGURA 4 - EFEITO DA COCAÍNA EM USVS USV DE 50 KHZ



FONTE: O autor (2023).

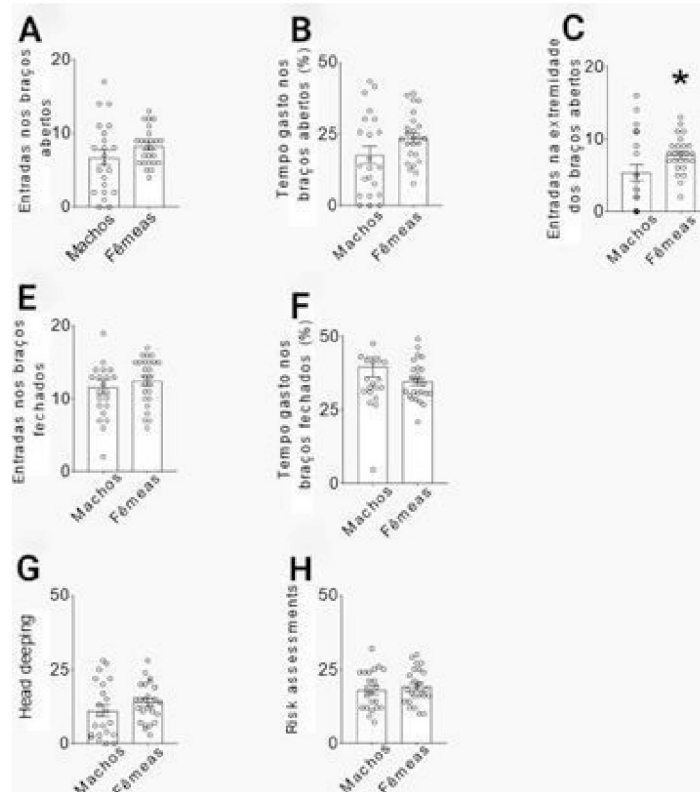
LEGENDA: As USVs de ratos adultos foram registradas durante 40 min em 3 sessões diárias: dia 1 – baseline; dia 2 - após injeção de solução salina; dia 3 - após uma injeção de 20 mg/kg de cocaína. **A.** Número total de USVs (média \pm SEM); * $P < 0.05$, em comparação com baseline, # $P < 0.05$, em comparação com soro fisiológico, teste de Sidak após RM-ANOVA. **B.** Porcentagem média de USVs de 50 kHz dos tipos *flat* (azul), *step* (amarelo), *trill* (verde) e *mix* (laranja); * $P < 0.05$, comparado a baseline; # $P < 0.05$, em comparação com solução salina, teste qui-quadrado. **C.** Número de USVs de

cada subtipo (média \pm SEM). **C.** * $P < 0.05$, comparado a baseline; # $P < 0.05$, em comparação com o dia em que os ratos receberam solução salina, teste de Dunn após Kruskal-Wallis ANOVA. Não foi encontrada uma diferença significativa entre machos e fêmeas ($P > 0.05$; Teste de Mann-Whitney). N= 25 fêmeas, 22 machos.

4.3 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Os dados do LCE que passaram nos testes de normalidade e homocedasticidade foram analisados pelo teste t de Student não-pareado (FIGURA 5A, 5C, 5D e 5G) e os dados que não passaram nesses testes foram analisados pelo teste t de Mann-Whitney (FIGURA 5B, 5F). A única diferença significativa observada entre machos e fêmeas foi no número de entradas na extremidade dos braços abertos Fig 3C ($P = 0.17$) Kruskal-Wallis ANOVA, $P = 0.04$, teste de Dunn). O teste de Mann-Whitney não detectou nenhuma diferença significativa entre os sexos foi observada no número de entradas nos braços abertos (FIGURA 5A, $P = 0.17$), na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (FIGURA 5B, $P = 0.08$), no número de entradas nos braços fechados (FIGURA 5D, $P = 0.19$), na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (FIGURA 5E, $P = 0.15$), no número de *head deppings* (FIGURA 5F, $P = 0.17$) e no número de *risk assessment* (FIGURA 5G, $P = 0.55$).

FIGURA 5 - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



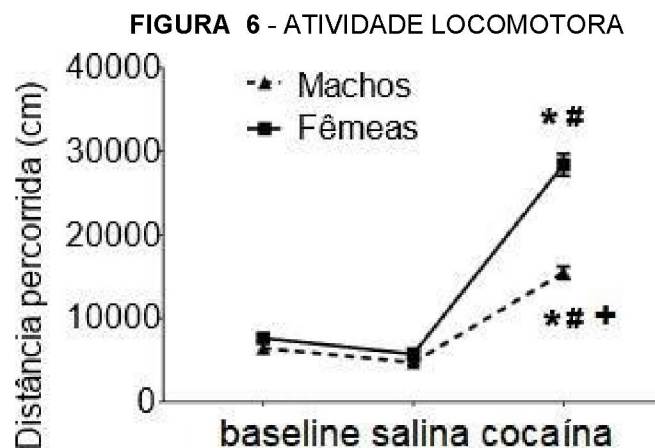
FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: **A.** Número de entradas nos braços abertos. **B.** Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. **C.** Número de entradas na extremidade dos braços abertos. **D.** Número de entradas nos braços fechados. **E.** Porcentagem de tempo gasto nos braços fechados. **F.** Número de *head deppings*. **G.** Número

de *risk assessment*. * $P < 0.05$ em relação ao sexo feminino (teste t de Student). Fêmeas (N=25), machos (N = 22). Os dados estão representados como média \pm SEM.).

4.4 ATIVIDADE LOCOMOTORA

A atividade locomotora foi avaliada como a distância percorrida pelos ratos durante a sessão de 40 minutos. Os dados foram transformados pela equação $\log(y+2)$ e analisados por RM-ANOVA. Esta análise mostrou um efeito significativo do sexo ($F(1,45) = 42.46$, $P < 0.001$), um efeito significativo do dia da sessão (tratamento) ($F(2,90) = 465.1$, $P < 0.001$) e uma interação significativa entre fatores de sessão e sexo ($F(2,90) = 13.68$, $P < 0.001$). Os testes post-hoc de Sidak detectaram um uma atividade locomotora significativamente maior após a administração de cocaína em comparação com os dias em que os ratos receberam solução salina e em comparação com o baseline tanto em machos como em fêmeas ($P < 0.001$). O teste de Sidak também mostrou que o efeito da cocaína na locomoção foi significativamente maior nas fêmeas em comparação aos machos ($P < 0.001$) (FIGURA 6).



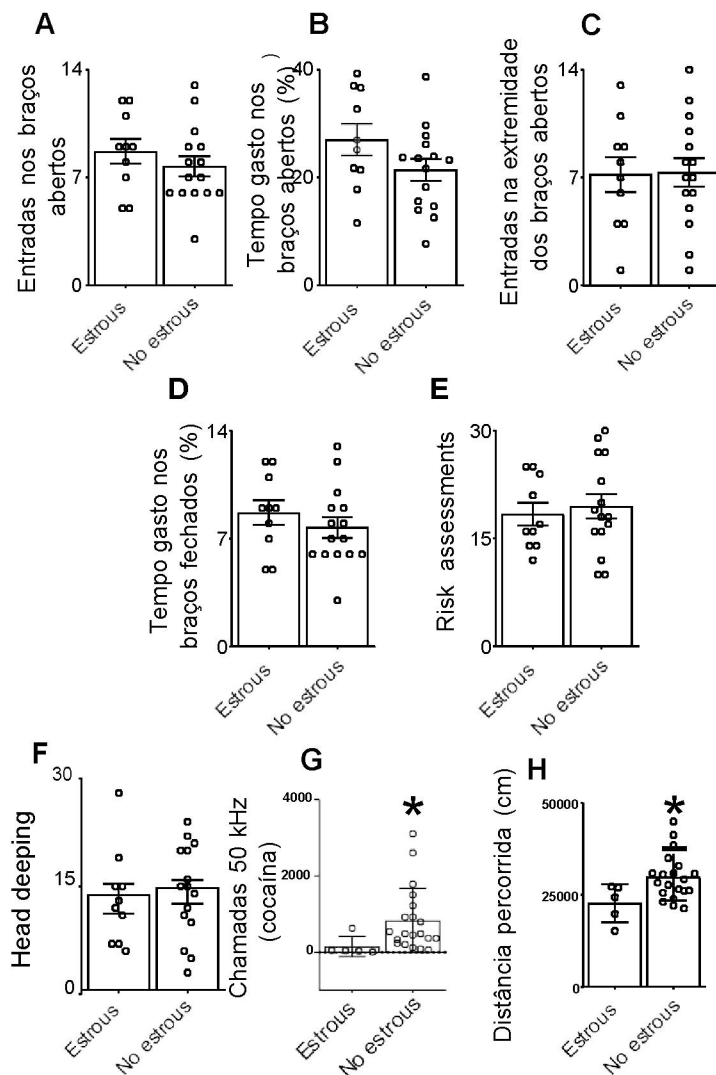
FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: A atividade locomotora (distância percorrida) dos ratos foram registradas durante uma sessão de 40 minutos e estão expressas como média \pm SEM. * $P < 0.05$, em comparação com o a sessão em que os ratos receberam solução salina; # $P < 0,05$, em comparação com o sessão de baseline, + $P < 0,05$, em comparação com as fêmeas. Teste de Tukey após ANOVA de medida repetida.

4.5 INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL DE RATAS ADULTAS NOS ESCORES DO LCE, ATIVIDADE LOCOMOTORA EVOCADA POR COCAÍNA E NO NÚMERO DE USVs DE 50 kHz EVOCADAS POR COCAÍNA

Os dados da FIGURA 7 passaram nos testes de normalidade e homocedasticidade e foram analisados pelo teste t de Student não pareado, exceto os dados da FIGURA 7, que foram transformados em log (y+2) antes de serem comparados com o teste t. Nenhuma diferença significativa nos escores do LCE foi observada entre as ratas que estavam nas fases de estro e não-estro (FIGURA 7A-F, $P = 0.11$). Por outro lado, o número de USVs de 50 kHz (FIGURA 7G, $P < 0.001$) e a atividade locomotora das ratas que estavam na fase não-estro foram significativamente maiores em comparação com as ratas que estavam na fase de estro (FIGURA 7H, $P < 0.05$).

FIGURA 7 - EFEITOS DO CICLO ESTRAL NOS ESCORES DE ANSIEDADE DO LCE, NÚMERO DE USVS EVOCADAS POR COCAÍNA E NA LOCOMOÇÃO EVOCADA POR COCAÍNA EM FÊMEAS ADULTAS



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: A. Número de entradas nos braços abertos. B. Porcentagem de tempo nos braços abertos. C. Número de entradas no final dos braços abertos. D. Porcentagem de tempo nos braços fechados.

E. Número de comportamentos de *risk assessment*. F. Número de comportamentos de *head dippings*. G. Número de USVs de 50 kHz na sessão de cocaína. H. Distância percorrida (cm) na sessão de cocaína. . * $P < 0.05$ comparado ao fêmeas na fase estro, teste t de Student não pareado. Os dados estão representados como média \pm SEM. Ao final do teste de LCE, 10 ratas estavam na fase de estro e 15 ratas estavam na fase de não-estro. Após a sessão onde foram registradas as USVs e a atividade locomotora, 5 ratas estavam na fase de estro e 20 ratas estavam na fase de não-estro.

4.6 CORRELAÇÕES ENTRE AS USVs DE 40 kHz REGISTRADAS ENQUANTO OS ANIMAIS ERAM FILHOTES E AS USVs DE 50 kHz E ESCORES DE ANSIEDADE NO TESTE DO DO LCE E DA ATIVIDADE LOCOMOTORA REGISTRADAS QUANDO OS ANIMAIS JÁ ERAM ADULTOS

As correlações de Pearson entre as USVs de 40 kHz dos filhotes e os comportamentos registrados nos adultos estão apresentadas na TABELA 2.

As USVs de 40 kHz das fêmeas apresentaram uma correlação positiva com as USVs de 50 kHz no dia em que receberam a injeção de solução salina (FIGURA 8, $r = 0.57$; $P = 0.01$). Curiosamente essa correlação (USVs filhotes vs USVs fêmeas adultas) não foi significativa para o dia de registro na sessão de *baseline* e exposição a cocaína (TABELA 2). Em relação aos ratos machos, não houve correlação positiva entre as USVs dos filhotes e dos ratos adultos para nenhuma das 3 sessões (TABELA 2).

As correlações entre o número de USVs de 40 kHz que os filhotes emitiram quando separados da mãe e os escores de ansiedade no teste do LCE foram calculadas para testar a hipótese de que o estado emocional dos filhotes determina seu estado emocional quando se tornaram adultos. Este teste mostrou uma correlação positiva significativa entre os USVs dos filhotes machos e o tempo que eles permaneceram nos braços abertos quando foram testados no LCE quando já eram adultos (FIGURA 8A, $r = 0.53$, $P = 0.01$). De forma coerente, observamos que houve uma correlação negativa significativa entre o número de USVs de 40 kHz dos filhotes e o tempo que eles permaneceram nos braços fechados do LCE coletados na idade adulta (TABELA 2). Esse resultado sugere que os ratos machos que fizeram um maior número de chamados para serem resgatados pelas mães quando foram retirados do ninho se mostraram menos ansiosos na idade adulta, resultado não observado nas fêmeas. O teste de Pearson não detectou nenhuma outra correlação significativa entre as USVs dos filhotes e demais comportamentos dos ratos adultos no LCE (TABELA 2). No dia em que os animais receberam uma injeção de solução salina, observamos

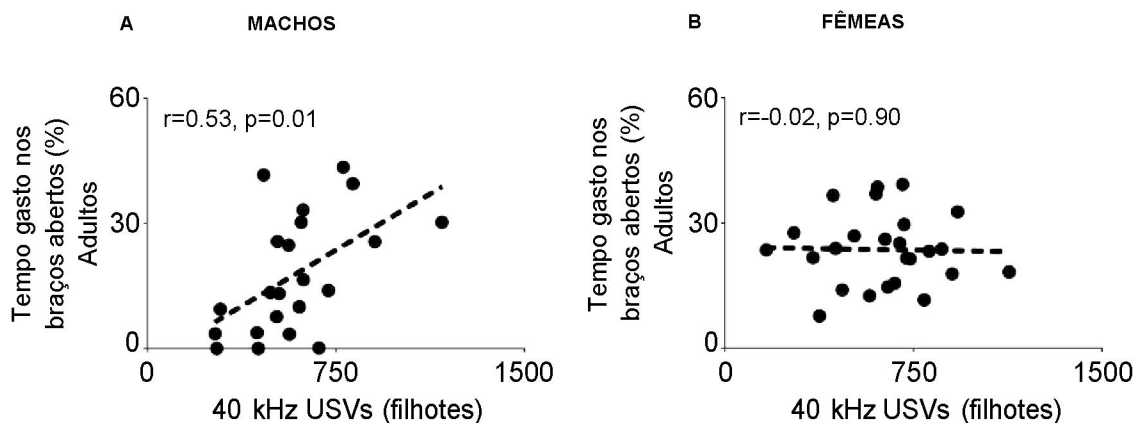
também uma correlação negativa significativa entre o número USVs de 40 kHz dos filhotes e a atividade locomotora dos ratos machos adultos (TABELA 2). Porém, nenhuma correlação entre esses parâmetros foi significativa quando a locomoção dos ratos machos foi registrada na sessão de *baseline* e na sessão de exposição a cocaína. Nas fêmeas, essa correlação também não foi significativa para nenhuma das sessões onde a atividade locomotora foi registrada (TABELA 2).

TABELA 2 - CORRELAÇÕES ENTRE USVs DE 40 kHz DE FILHOTES E USVs DE 50 kHz DE ADULTOS, LCE E ESCORES DE LOCOMOÇÃO

		MACHOS		FÊMEAS	
		r	P	r	P
50 kHz USVs	Total de USVs (baseline)	0,05	0,81	0,14	0,49
	Total de USVs (salina)	0,09	0,68	0,57	0,001
	Total de USVs (cocaína)	-0,13	0,54	-0,08	0,67
	USVs do tipo <i>Flat</i>	-0,13	0,53	-0,08	0,68
	USVs do tipo <i>Step</i>	-0,05	0,82	-0,21	0,30
	USVs do tipo <i>Trill</i>	0,12	0,58	0,03	0,88
	USVs do tipo <i>Mix</i>	-0,14	0,51	-0,03	0,86
LCE	Entradas nos braços abertos	-0,01	0,96	0,21	0,31
	Tempo nos braços abertos (%)	0,53	0,001	-0,02	0,90
	Entradas no final dos braços abertos	-0,06	0,77	0,26	0,20
	Entradas nos braços fechados	0,09	0,68	0,10	0,62
	Tempo nos braços fechados (%)	-0,45	0,001	-0,22	0,27
LOCOMOÇÃO	Dia baseline	-0,22	0,30	0,21	0,30
	Dia de salina	-0,52	0,001	0,12	0,56
	Dia de Cocaína	-0,11	0,60	-0,08	0,70

FONTE: O autor (2023).

FIGURA 8 - CORRELAÇÕES ENTRE USVs DE 40 kHz EM FILHOTES E ESCORES DE ANSIEDADE EM ADULTOS



FONTE: O autor (2023).

NOTA: Os dados foram analisados pelo teste de Pearson. **A.** $P < 0.05$ demonstrando uma significativa correlação entre tempo nos braços abertos do LCE e a emissão de USVs de 40 kHz durante a infância em machos. **B.** $P = 0.02$ demonstrando a não existência de uma significativa correlação entre tempo nos braços abertos do LCE e a emissão de USVs de 40 kHz durante a infância em fêmeas.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, propomos a hipótese de que as vocalizações ultrassônicas infantis estavam intimamente correlacionadas com o comportamento do tipo ansioso na idade adulta. Nesse sentido, uma maior emissão dessas USVs de 40kHz poderia ser um valioso índice para mensurar esses comportamentos, inclusive, a emissão acentuada nas USVs de 50 kHz após a administração aguda de cocaína.

Os objetivos principais desse trabalho foram testar a correlação entre as USVs de 40 kHz emitidas na infância e se essas prediziam comportamentos do tipo ansioso e o efeito da cocaína em USVs de 50 kHz em ratos adultos. Observamos que o número de USVs de 40 kHz medidos na infância de ratos machos estava significativamente correlacionado com o tempo gasto nos braços abertos de um LCE. No entanto, tal correlação não foi observada em ratas fêmeas (FIGURA 8). Estudos prévios já demonstraram que taxas elevadas na emissão de USV na infância mediadas por isolamento podem ser determinantes fatores para um índice elevado de ansiedade na idade adulta (BRUNELLI *et al.*, 2015).

Sendo o LCE um teste baseado na aversão a espaços abertos que roedores possuem naturalmente (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2018), os resultados sustentam a nossa hipótese inicial apesar das fêmeas não apresentarem um resultado similar. Quando pontuados individualmente, as fêmeas apresentam menor ansiedade que os machos no teste do LCE, quando analisamos o maior número de entradas na extremidade dos braços abertos no teste LCE (FIGURA 5C). Observamos também que os machos apresentaram maiores níveis de comportamento ansioso. Além disso, o sexo e a fase estral não afetaram nenhuma adicional variável avaliada durante o teste de LCE (FIGURA 5 e FIGURA 7).

Ratos filhotes produzem USVs com uma frequência média entre 30 e 65 kHz em várias situações de estresse como quando separados de sua mãe e da ninhada, mudanças bruscas de temperatura e presença de odores desconhecidos (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2001; HOFER, 1996; OSWALT; MEIER, 1975; SIMOLA, 2015). Essas chamadas são direcionadas intencionalmente a mãe para atrair a sua atenção e direcionar seus cuidados como recuperação, higiene e lactação (BROUETTE-LAHLOU; VERNET-MAURY; VIGOUROUX, 1992; HASHIMOTO *et al.*, 2001; TERKEL; DAMASSA; SAWYER, 1979; WÖHR; SCHWARTING, 2008). Além disso, mães expostas a um filhote que emite USV apresentam maior nidificação e

liberação de prolactina, hormônio esse envolvido na amamentação e no comportamento materno (HASHIMOTO *et al.*, 2001; MANN; BRIDGES, 2001).

Estudos anteriores demonstraram que há uma diferença significativa entre as USVs infantis de machos e fêmeas. No entanto, em nosso trabalho não encontramos esse resultado (FIGURA 3). Nesse sentido, uma das hipóteses para a ausência de diferença sexual entre os filhotes pode estar relacionada com a grande variabilidade individual das USVs, principalmente entre os filhotes machos. Filhotes machos com 2 até 13 dias após seu nascimento produzem mais USVs de alarme com uma frequência e amplitude média mais baixa (NAITO; TONOUE, 1987; BOWERS *et al.*, 2013). Essa característica acústica promove a recuperação preferencial do macho pela mãe, priorizando os cuidados maternos e a atenção, aumentando de forma substancial os índices de sobrevivência do filhote. Portanto, o dimorfismo sexual das USVs de alerta podem resultar na mãe um senso de cuidado, priorizando a sobrevivência do filhote macho (LENELL *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, não analisamos os cuidados maternos referentes a ninhada, mas possivelmente as USVs dos filhotes machos e não das fêmeas podem ter impactado o comportamento do tipo ansioso na idade adulta. Em roedores, o cuidado materno afeta de forma substancial o comportamento emocional na idade adulta. Um valor elevado na emissão de USVs de alarme é considerado como um aspecto ansioso no filhote pois sabe-se que as USVs induzidas por isolamento são atenuadas pela administração de compostos ansiolíticos e antidepressivos em ratos com 6 a 10 dias de idade (ISOBE, KAWAGUCHI 2019; INSEL; HILL; MAYOR, 1986). Portanto, experiências negativas no início da vida são passíveis de moldar o desenvolvimento, impactando de modo profundo o comportamento (BEERY; FRANCIS, 2011).

A assimetria dos cuidados maternos, como lambar e cuidados como a higiene, em particular contribui para o desenvolvimento de diferenças individuais em situações que envolvem indicadores subjetivos de ansiedade. Isso pode significar que essas diferenças no cuidado individual dos filhotes afetam a reatividade da prole adulta ao estresse. Especificamente, filhotes de mães que apresentam altos níveis de cuidado, evidenciam níveis mais baixos de comportamento do tipo ansioso e uma reação reduzida ao estresse na idade adulta (CALDJI *et al.*, 1998; FRANCIS *et al.*, 1999; MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004; MENARD; HAKVOORT, 2007; ZHANG *et al.*, 2005). Portanto, a correlação entre filhotes machos de 40 kHz e o

comportamento relacionado à ansiedade em ratos adultos pode ser um bom modelo para estudar o efeito do vínculo mãe-bebê humano na expressão de comportamentos de ansiedade durante a idade adulta.

Como os chamados dos filhotes de ratos são considerados como uma medida de vínculo entre a mãe e o filhote (WÖHR; SCHWARTING, 2008) e este fator comportamental durante a infância demonstrou ter efeitos duradouros na vulnerabilidade ao abuso de drogas (BREMNER; VERMETTEN, 2001), esperávamos que as USVs de 40 kHz seriam preditivas do efeito da cocaína nas USVs de 50 kHz em adultos. No entanto, nossos resultados não suportam esta hipótese: os efeitos agudos da cocaína em adultos não foram correlacionados com as USVs de 40 kHz (TABELA 2). Isso não significa que se possa contestar a hipótese de que o cuidado materno impacta o risco de abuso de drogas em adultos.

Em humanos, mudanças no estilo de cuidado parental em uma idade precoce têm um efeito profundo no bem-estar mental das crianças. Filhos expostos a pais rígidos têm uma maior probabilidade de desenvolver distúrbios afetivos, como ansiedade e depressão na idade adulta (RAPEE, 1997) e podem ser mais resistentes ao tratamento medicamentoso nessas patologias (CHAMBERS; POWER; DURHAM, 2004, SAKADO *et al.*, 2000).

Em roedores, a exposição no início da vida a níveis relativamente baixos de lambidas e outras formas de interação materna resulta em um aumento do comportamento do tipo ansioso. Francis e Kuhar (2008) analisaram a correlação entre os índices de lambidas genitais (LG) com o consumo de drogas (cocaína) e observaram que níveis mais altos de LG se correlacionavam com um menor consumo de drogas de abuso.

No presente estudo, não foi avaliado o comportamento da mãe em relação a ninhada. Os filhotes foram separados das mães apenas uma vez (5 min) e para o procedimento de registro da emissão de USVs. Esta situação está longe de expor os filhotes a uma condição estressante severa. Moffett e colaboradores (2006) examinaram a autoadministração de cocaína em ninhadas submetidas a variações na separação e manejo materno. Grupos de filhotes foram separados por 0 min, 15 min ou 180 min. As separações foram realizadas do dia pós-natal (2) e os experimentos de autoadministração foram realizados na idade adulta, por volta de 90 dias. Quanto mais tempo separado da ninhada mais fácil era a aquisição da autoadministração de cocaína.

Além disso, o efeito agudo de recompensa da cocaína em adultos é apenas um dos vários fatores que afetam a propensão à adicção em cocaína e outras drogas de abuso. Está bem estabelecido em humanos que as experiências negativas na primeira infância têm um impacto profundo no estado emocional dos adultos (BEERY; FRANCIS, 2011). Uma das limitações do nosso trabalho foi não ter avaliado se os índices de emissão de USVs de 40kHz poderiam estar associadas ao uso crônico da cocaína, na atividade locomotora e nas USVs de 50kHz. Um aspecto importante a se mensurar é a inclusão de outros testes comportamentais como CPP e o método de autoadministração. Vale ressaltar que, nos modelos animais, o uso crônico é o mais adequado método para analisarmos o esforço para se obter a droga, fissura, abstinência entre outras variáveis. Fazer essa correlação com as USVs de 40 kHz é de fato importante para o estudo de fatores relacionados a dependência.

No presente estudo, a falta de correlação significativa entre os escores de LCE e USVs de 50 kHz sugere que as diferenças no estado semelhante à ansiedade entre os ratos não foram fortes o suficiente para impactar o fator de recompensa da cocaína. Novamente, isso não quer dizer que a ansiedade não afete o efeito recompensador da cocaína. Comparados aos não usuários, os usuários de cocaína têm duas vezes mais chances de apresentar transtornos de humor ou ansiedade (HEDDEN; MALCOLM; LATIMER, 2009).

Em nosso trabalho, os ratos não foram submetidos a situações ansiogênicas antes da administração de cocaína. Portanto, leves diferenças no estado semelhante à ansiedade dos ratos não foram fortes o suficiente para impactar o efeito recompensador do tratamento agudo com cocaína. De fato, outros estudos mostraram que a ansiedade é um fator de risco importante para a dependência de drogas. O sexo também tem forte influência nos transtornos de humor, ansiedade e uso de cocaína (ALTEMUS; SARVAIYA; EPPERSON, 2014).

Um achado importante do presente estudo foram as semelhanças e diferenças entre machos e fêmeas. Em ratas *Wistar*, o ciclo estral pode iniciar após 30 dias, quando ocorre a abertura da entrada vaginal (ALLEN, 1922; COOPER; GOLDMAN; VANDENBERGH, 1998). Antes que os hormônios do ciclo estral estivessem presentes (filhotes), nenhuma diferença significativa entre os sexos foi observada (FIGURA 3). Por outro lado, o sexo e a fase, do ciclo estral afetaram os efeitos da cocaína e os escores de ansiedade no teste LCE. A cocaína causou um efeito mais potente nas fêmeas do que nos machos na atividade locomotora e na expressão de USVs de 50 kHz. Estudos clínicos

sugerem que um dos aspectos biológicos que desempenham um papel na TUS é o sexo. Em média, as mulheres iniciam o uso de cocaína mais cedo (GRIFFIN *et al.*, 1989) e relatam usar cocaína com maior frequência (KOSTEN *et al.*, 1993) do que os homens. As mulheres também relataram níveis subjetivos mais altos de nervosismo após a administração intranasal (KOSTEN *et al.*, 1996) e níveis mais altos de afeto negativo e desejo em resposta a sinais e estressores relacionados à cocaína durante a abstinência (BACK *et al.*, 2005; ELMAN; KARLSGODT; GASTFRIEND, 2001; MORAN-SANTA MARIA *et al.*, 2014; 2016).

Embora homens e mulheres se tornem adictos em cocaína, as mulheres podem se tornar mais rapidamente e têm uma maior dificuldade em manter a abstinência. Há um mecanismo dependente do ciclo estral que leva ao aumento da recompensa por cocaína em fêmeas. Durante o estro, a atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) é aumentada e leva a modificações pós-traducionais no transportador de dopamina (DAT) para aumentar a capacidade da cocaína de inibir sua função, um efeito mediado pelo estradiol (CALIPARI *et al.*, 2014).

Além disso, a administração de alopregnanolona, metabólito da progesterona, inibiu a busca por cocaína induzida por estresse e estimulação em mulheres (FOX *et al.*, 2013; MILIVOJEVIC *et al.*, 2016), bem como as propriedades recompensantes da cocaína em mulheres e homens (SOFUOGLU *et al.*, 2004). Assim, em mulheres o estrogênio, progesterona e alopregnanolona podem desempenhar um papel importante no TUS.

A atividade locomotora e a emissão de USVs de 50kHz e o efeito da cocaína foi mais forte em fêmeas que estavam na fase não estral durante os registros de USV e locomoção. Isso sugere que o hormônio estrogênio, que está em maior concentração sanguínea durante a fase não estral (QUIÑONES-JENAB *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2014) podem ter potencializado esses efeitos agudos da cocaína. Estudos anteriores mostraram que a progesterona diminui as USVs de 50 kHz, e o estrogênio apresenta o efeito oposto (LENELL *et al.*, 2021). Outros estudos também demonstraram que a progesterona atenua e o estrogênio potencializa os efeitos da cocaína e outras drogas estimulantes na atividade locomotora (SOUZA *et al.*, 2014; PEART *et al.*, 2022).

Tomados em conjunto, os estudos atuais e anteriores sugerem que os efeitos mais fortes da cocaína que observamos em ratas durante a fase não estral foram, pelo menos em parte, devido a uma maior concentração de estrogênio. Outros estudos buscando

avaliar os efeitos de hormônios esteróides em USVs de 50 kHz evocadas por cocaína são necessários para testar essa hipótese. Isso pode ser importante para planejar o melhor momento para aplicar os procedimentos terapêuticos às fêmeas em TUC.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, no presente estudo, descobrimos que altos índices de USVs de 40 kHz em filhotes machos estão correlacionados com menor comportamento ansioso no LCE em machos. Esse achado pode estar relacionado à forma como mães de ratos em diferentes fases do ciclo estral respondem aos chamados dos filhotes machos e fêmeas. Essa diferenciação apresenta várias nuances e, de acordo com a literatura, pode vir também da forma mais reponsiva em que filhotes machos alertam a fêmea quando os mesmos estão longe do ninho e da ninhada. Contudo, uma melhor investigação com ênfase no comportamento materno se faz necessário.

Também encontramos ratas adultas expressando comportamentos menos ansiosos e efeitos mais intensos da cocaína sobre a atividade locomotora e chamados de 50 kHz. Quando separamos as fêmeas em diferentes fases do ciclo estral notamos que uma resposta dependente dos hormônios circulantes é nitidamente o responsável por essa característica.

Apesar dos resultados não corroborarem com a hipótese inicial, nosso trabalho poderá nortear futuras investigações sobre o papel das vocalizações infantis no comportamento na idade adulta, análises do perfil ansioso e a busca por marcadores precoces, tanto para mensurar os efeitos da administração de cocaína quanto para observar as características que moldam o comportamento de ratos machos e fêmeas.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, E. The oestrous cycle in the mouse. **American Journal of Anatomy**, v. 30,n.3, p. 297-347, 1922. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aja.1000300303>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; EPPERSON, C. N. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 320-330, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.004>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- ANTHONY, J. C Novel phenotype issues raised in cross-national epidemiological research on drug dependence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 353-369, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05419.x>. Acesso em: 06 set. 2022.
- APA. AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV**. 5 ed. Washington: American Psychiatric Association, 2013.
- ARAUJO, M. R. de; LARANJEIRA, R.; DUNN, J. Cocaína: bases biológicas da administração, abstinência e tratamento. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 1, p. 1–27, 1988. Disponível em: https://www.uniad.org.br/wp-content/uploads/2013/11/Cocaina-_bases-biologicas-da-administracao-abstinencia-e-tratamento.pdf. Acesso em: 28 nov. 2022.
- BACK, S. E. *et al.* Gender differences in stress reactivity among cocaine-dependent individuals. **Psychopharmacology**, v. 180, n. 1, p. 169-176, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2129-7>. Acesso em: 03 jan. 2023.
- BARDO, M. T.; HORTON, D. B.; YATES, J. R. Conditioned Place Preference as a Preclinical Model for Screening Pharmacotherapies for Drug Abuse. *In*: MARKGRAF, C.G., HUDZIK, T.J., COMPTON, D.R. (EDS.) **Nonclinical Assessment of Abuse Potential for New Pharmaceuticals**. Academic Press, Boston, 2015, p. 151–196. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420172-9.00007-2>. Acesso em: 18 out. 2022.
- BARKER, D. J.; SIMMONS, S. J.; WEST, M. O. Ultrasonic Vocalizations as a Measure of Affect in Preclinical Models of Drug Abuse: A Review of Current Findings. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 193–210, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x13999150318113642>. Acesso em: 18 out. 2022.
- BEERY, A. K.; FRANCIS, D. D. Adaptive significance of natural variations in maternal care in rats: A translational perspective. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 7, p. 1552–1561, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2011.03.012>. Acesso em: 30 out. 2022.
- BECKER, J. B.; KOOB, G. Sex differences in animal models: focus on addiction. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 2, p. 242-263, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.115.011163>. Acesso em: 03 jan. 2023.

BENMANSOUR, S. *et al.* Impact of Ovarian Hormones on the Modulation of the Serotonin Transporter by Fluvoxamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 555-564, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2008.23>. Acesso em: 17 dez. 2022.

BLANCHARD, R. J. *et al.* The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 463–472, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80069-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80069-7). Acesso em: 30 out. 2022.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Anti-predator defense as models of animal fear and anxiety. *In*: BRAIN, P. F. *et al.* **Fear and defence**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1990, p. 89-108.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/0735-7036.103.1.70>. Acesso em: 11 dez. 2022.

BOULANGER-BERTOLUS, J. *et al.* Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13518-6>. Acesso em: 03 jan. 2023.

BOWERS, J. M. *et al.* Foxp2 mediates sex differences in ultrasonic vocalization by rat pups and directs order of maternal retrieval. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 8, p. 3276-3283, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0425-12.2013>. Acesso em: 17 dez. 2022.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 49-56, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00277-7). 13 fev. 2023.

BREMNER, J. D.; VERMETTEN, E. Stress and development: behavioral and biological consequences. **Development and Psychopathology**, v. 13, n. 3, p. 473–489, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0954579401003042>. Acesso em: 18 out. 2022.

BROUETTE-LAHLOU, I.; VERNET-MAURY, E.; VIGOUROUX, M. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: Pups' anogenitallicking. **Behavioural Brain Research**, v. 50, n. 1-2, p.147–154, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80296-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80296-7). Acesso em: 20 fev. 2023.

BRUDZYNSKI, S. M. Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. **Brain Science**, v. 11, n. 5, p. 1-44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/brainsci11050605>. Acesso em: 10 nov. 2022.

BRUDZYNSKI, S. M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **ILAR Journal**, v. 50, n. 1, p. 43–50, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ILAR.50.1.43>. Acesso em: 28 nov. 2022.

BRUDZYNSKI, S. M. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 310–317, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2013.01.014>. Acesso em: 18 out. 2022.

BRUDZYNSKI, S. M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 180-192, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x13999150210141444>. Acesso em: 28 nov. 2022.

BRUDZYNSKI, S. M. Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 261–273, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.03.004>. Acesso em: 28 nov. 2022.

BRUNELLI, S. A. *et al.* Variations in maternal behavior in rats selected for infant ultrasonic vocalization in isolation. **Hormones and Behavior**, v. 75, p. 78–83, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2015.08.007>. Acesso em: 30 out. 2022.

BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. The neurobiology of positive emotions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 173-187, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.06.001>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CALDJI, C. *et al.* Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5335-5340, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5335>. Acesso em: 17 dez. 2022.

CALIPARI, E. S. *et al.* Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. **Nature communications**, v. 8, p. 1-15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms13877>. Acesso em: 12 jan. 2023.

CARTER, M.; SHIEH, J. Animal Behavior. *In*: CARTER, M.; SHIEH, J. (Eds.). **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 2015.p. 39–71.

CHAMBERS, J. A.; POWER, K. G.; DURHAM, R. C. The relationship between trait vulnerability and anxiety and depressive diagnoses at long-term follow-up of Generalized Anxiety Disorder. **Anxiety Disorders**, v. 18, p. 587-607, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2003.09.001>. Acesso em: 12 jan. 2023.

CHAN, B. *et al.* Pharmacotherapy for Cocaine Use Disorder-a Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of General Internal Medicine**, v. 34, n. 12, p. 2858–2873, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11606-019-05074-8>. Acesso em: 18 out. 2022.

COFFEY, K. R.; MARX, R. E.; NEUMAIER, J. F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. *Neuropsychopharmacology*, v. 44, n. 5, p. 859-868, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>. Acesso em: 17 dez. 2022.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH, J. G. Monitoring of the estrous cycle in laboratory rodent by vaginal lavage. *In*: HEINDEL, J. J.; CHAPIN, R. E. **Female reproductive toxicology**. London: Academic Press; 1998. p.45-56.

CORDEIRO, N.; PINTO, R. M. C. Consumo de estimulantes cerebrais em acadêmicos da área da saúde na cidade de Ponta Grossa-PR. **Visão acadêmica**, v. 18, n. 2, p. 23-45, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/acd.v18i2.53234>. Acesso em: 06 set. 2022.

CUNHA, C. da; GOMEZ-A, A.; BLAHA, C. D. The role of the basal ganglia in motivated Behaviour. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, p. 747–767, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0063>. Acesso em: 30 out. 2022.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5274–5278, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.14.5274>. Acesso em: 17 dez. 2022.

DU SERT, N. P. *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **Plos Biology**, v. 18, n. 7, p. 1-65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411.4>. Acesso em: 28 nov. 2022.

DUALIBI, L. B.; RIBEIRO, M.; LARANJEIRA, R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, s. 4, p. 545–557, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2008001600007>. Acesso em: 11 dez. 2022.

ELMAN, I.; KARLSGODT, K. H.; GASTFRIEND, D. R. Gender differences in cocaine craving among non-treatment-seeking individuals with cocaine dependence. **American Journal of Drug Alcohol Abuse**, v. 27, n. 1, p. 193-202, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1081/ADA-100103705>. Acesso em: 11 dez. 2022.

FARRELL, M. *et al.* Responding to global stimulant use: challenges and opportunities. **The Lancet**, v. 394, n. 10209, p. 1652–1667, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32230-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32230-5). Acesso em: 26 set. 2022.

FERREIRA, P. E. M.; MARTINI, R. K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96–99, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-44462001000200008>. Acesso em: 10 nov. 2022.

FOX, H. C. *et al.* The effects of exogenous progesterone on drug craving and stress arousal in cocaine dependence: impact of gender and cue type. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1532-1544, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.12.022>. Acesso em: 17 dez. 2022.

FRANCIS, D. *et al.* Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, p. 1155-1158, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1155>. Acesso em: 17 dez. 2022.

FRANCIS, D. D.; KUHAR, M. J. Frequency of maternal licking and grooming correlates negatively with vulnerability to cocaine and alcohol use in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 3, p. 497-500, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.04.012>. Acesso em: 20 fev. 2023.

FRAZER, K. M.; RICHARDS, Q.; KEITH, D. R. The long-term effects of cocaine use on cognitive functioning: A systematic critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 241–262, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2018.04.005>. Acesso em: 28 nov. 2022.

GORDON, J. A.; HEN, R. The serotonergic system and anxiety. **Neuromolecular Medicine**, v. 5, p. 27-40, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/NMM:5:1:027>. Acesso em: 17 dez. 2022.

GRIFFIN, M. L. *et al.* A comparison of male and female cocaine abusers. **Archives of General Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 122-126, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1989.01810020024005>. Acesso em: 27 dez. 2022.

HASHIMOTO, H. *et al.* Prolactin levels and maternal behavior induced by ultrasonic vocalizations of the rat pup. **Experimental animals**, v. 50, n. 4, p. 307-312, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1538/expanim.50.307>. Acesso em: 20 fev. 2023.

HEDDEN, S. L.; MALCOLM, R. J.; LATIMER, W. W. Differences between adult non-drug users versus alcohol, cocaine and concurrent alcohol and cocaine problem users. **Addictive Behaviors**, v. 34, p. 323-326, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2008.11.001>. Acesso em: 20 fev. 2023.

HITNER, H.; NAGLE, B. **Pharmacology: An introduction**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 2016.

HOFER, M. A. On the nature and consequences of early loss. Review. **Psychosomatic Medicine**, v. 58, n. 6, p. 570-581, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00006842-199611000-00005>. Acesso em: 19 fev. 2023.

HOWELL, L. L.; CUNNINGHAM, K. A. Serotonin 5-HT₂ receptor interactions with dopamine function: implications for therapeutics in cocaine use disorder. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 1, p. 176–197, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.114.009514>. Acesso em: 28 nov. 2022.

HUSTON, J. P. *et al.* What's conditioned in conditioned place preference? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 162–166, 2013. Disponível em: [10.1016/j.tips.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.01.004). Acesso em: 18 out. 2022.

IKEMOTO, S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Research**

Reviews, v. 56, n. 1, p. 27-28, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2007.05.004>. Acesso em: 12 jan. 2023.

INSEL, T. R.; HILL, J. L.; MAYOR, R. B. Rat pup ultrasonic isolation calls: Possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 5, p. 1263-1267, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90182-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90182-6). Acesso em: 12 fev. 2023.

ISOBE, A.; KAWAGUCHI, M. Relationship between motor function and ultrasonic vocalizations induced by maternal separation in rat pups. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 81, n. 2, p. 287-293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0604>. Acesso em: 12 fev. 2023.

JOHNSON, A. R. *et al.* Amphetamine maintenance differentially modulates effects of cocaine, methylenedioxypyrovalerone (MDPV), and methamphetamine on intracranial self-stimulation and nucleus accumbens dopamine in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 8, p. 1753-1762, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41386-018-0071-3>. Acesso em: 06 set. 2022.

JUAREZ, B.; HAN, M. H. Diversity of Dopaminergic Neural Circuits in Response to Drug Exposure. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 10, p. 2424–2446, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2016.32>. Acesso em: 12 jan. 2023.

KARCH, S. B. Cocaine: History, use, abuse. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 8, p. 393–397, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/014107689909200803>. Acesso em: 03 jan. 2023.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13. ed. São Paulo: McGrawHill, 2017.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NPP.2009.110>. Acesso em: 12 jan. 2023.

KOSTEN, T. A. *et al.* Gender differences in cocaine use and treatment response. **Journal of substance abuse treatment**, v. 10, p. 63-66, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0740-5472\(93\)90100-g](https://doi.org/10.1016/0740-5472(93)90100-g). Acesso em: 03 jan. 2023.

KRAEUTER, A.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. Neuropsychiatric Sequelae of Early Nutritional Modifications: A Beginner's Guide to Behavioral Analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1735, p. 403-420, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7614-0_28. Acesso em: 12 jan. 2023.

LA PARRA, H. **La maldición blanca: el papel de España en el tráfico de cocaína**. 1 ed. Madrid: Ediciones El País, 1989.

LENELL, C. *et al.* Biological and Acoustic Sex Differences in Rat Ultrasonic Vocalization. **Brain Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1-23, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/brainsci11040459>. Acesso em: 28 nov. 2022.

LENT, R. **Cem Bilhões de neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência.** 2 ed. v. 11, Rio de Janeiro: Atheneu, 1994.

LOPEZ-QUINTERO, C. *et al.* Probability and predictors of transition from first use to dependence on nicotine, alcohol, cannabis, and cocaine: Results of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). **Drug and Alcohol Dependence**, v. 115, n. 1-2, p. 120-130, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2010.11.004>. Acesso em: 12 jan. 2023.

MACLEAN, P. D. The limbic system with respect to self-preservation and the preservation of the species. **The journal of nervous and mental disease**, v. 127, n. 1, p. 1-11, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00005053-195807000-00001>. Acesso em: 06 set. 2022.

MAJORI, S. *et al.* Brain doping: Stimulants use and misuse among a sample of Italian college students. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p.130-140, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584082/>. Acesso em: 06 set. 2022.

MALINOWSKI, B. W. The problem of meaning in primitive languages. *In*: MAYBIN, J. **Language and Literacy in Social Practice.** Milton Keynes: The Open University, 1993.

MANN, P. E.; BRIDGES, R. S. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Prog Brain Res.*, v. 133, p. 251-262, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(01\)33019-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(01)33019-4). Acesso em: 03 jan. 2023.

MENARD, J. L.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. P. Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 297-308, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.009>. Acesso em: 03 jan. 2023.

MENARD, J. L.; HAKVOORT, R. M. Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: evidence for a threshold model. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 2, p. 302-313, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.014>. Acesso em: 03 jan. 2023.

MILIVOJEVIC, V. *et al.* Effects of progesterone stimulated allopregnanolone on craving and stress response in cocaine dependent men and women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, p. 44-53, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.12.008>. Acesso em: 13 fev. 2023.

MOFFETT, J. K. *et al.* Randomized trial of two physiotherapy interventions for primary care neck and back pain patients: 'McKenzie' vs brief physiotherapy pain management. **Rheumatology (Oxford)**, v. 45, n. 12, p. 1514-1521, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel339>. Acesso em: 03 jan. 2023.

MORAN-SANTA MARIA, M. M. *et al.* Effects of yohimbine and drug cues on impulsivity and attention in cocaine-dependent men and women and sex-matched controls. **Drug**

and **Alcohol Dependence**, v. 162, p. 56-63, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.02.021>. Acesso em: 03 jan. 2023.

MORAN-SANTA MARIA, M. M. *et al* Yohimbine administration and cue-reactivity in cocaine-dependent individuals. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 4157-4165, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-014-3555-9>. Acesso em: 03 jan. 2023.

NAITO, H.; TONOUE, T. Sex difference in ultrasound distress call by rat pups. **Behavioural Brain Research**, v. 25, n. 1, p. 13-21, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90041-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90041-6). Acesso em: 28 nov. 2022.

NAUTA, W.J. The Central Visceromotor System: A General Survey. *In*: HOCKMAN, C. H. **System Mechanisms and Autonomic Function**. Springfield: Publishers, 1972, p. 21-38.

NIDA. NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. **Principles of Drug Addiction Treatment: A Research-Based Guide**. 3 ed. Carolina do Sul: CreateSpace Independent Publishing Platform, 2018.

OSWALT, G. L.; MEIER, G. W. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dev.420080205>. Acesso em: 18 fev. 2023.

PEART, D. R. *et al*. Regulation of cocaine-related behaviours by estrogen and progesterone. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.135, p.1-32, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104584>. Acesso em: 03 jan. 2023.

PEREIRA, M. *et al*. Amphetamine induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania? **Psychopharmacology**, v. 231, p. 2567-2577, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3413-1>. Acesso em: 03 jan. 2023.

PICKENS, R.; THOMPSON, T. Cocaine-reinforced behavior in rats: effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio size. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 161, n. 1, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5648489/>. Acesso em: 30 out. 2022.

PIERCE, R. C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-238, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.016>. Acesso em: 06 set. 2022.

QUIÑONES-JENAB, V. *et al*. Cocaine Affects Progesterone Plasma Levels in Female Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 449-453, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00213-6](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00213-6). Acesso em: 28 nov. 2022.

RAPEE, R. M. Potential role of childrearing practices in the development of anxiety and depression. **Clinical Psychology Review**, v. 17, n. 1, p. 47–67, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0272-7358\(96\)00040-2](https://doi.org/10.1016/S0272-7358(96)00040-2). Acesso em: 12 jan. 2023.

RIPPBERGER, H. *et al.* Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine- Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 220–232, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x1302150525124408>. Acesso em: 12 jan. 2023.

ROBINSON, T. E. Neuroscience. Addicted rats. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 951–953, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1102496>. Acesso em: 10 nov. 2022.

SAKADO, K. *et al.* The relationship between personality, dysfunctional parenting in childhood, and lifetime depression in a sample of employed Japanese adults. **Journal of Affective Disorders**, v. 60, n. 1, p. 47-51, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(99\)00150-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00150-0). Acesso em: 12 jan. 2023.

SANIOTIS, A. *et al.*, “Messing with the mind”: Evolutionary challenges to human brain augmentation. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00152>. Acesso em: 03 jan. 2023.

SANCHEZ, W. N. *et al.* Diazepam attenuates the effects of cocaine on locomotion, 50-kHz ultrasonic vocalizations and phasic dopamine release in the nucleus accumbens of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 8, p. 1565-1577, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.15658>. Acesso em: 28 nov. 2022.

SHAHRIER, M. A.; WADA, H. Effects of Ethanol Exposure during Lactation on Ultrasonic Vocalizations of Rat Pups upon. Their Isolation: Increase in Pup Distress Calls. **Brain Sciences**, v. 11, n. 9, p. 1-17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/BRAINSC111091249>. Acesso em: 12 jan. 2023.

SIMOLA, N. Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 164-179, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159X13999150318113800>. Acesso em: 28 nov. 2022.

SKINNER, B. F. **Science and human behavior**. New York: Free Press, 1953.

SKINNER, B. F. **The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis**. Cambridge: Appleton-Century, 1938.

SOFUOGLU, M.; MITCHELL, E.; KOSTEN, T. R. Effects of progesterone treatment on cocaine responses in male and female cocaine users. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 78, p. 699-705, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.05.004>. Acesso em: 10 nov. 2022

SOHN, S. *et al.* Linking of NMDA receptors and mGluR5 in the nucleus accumbens core to repeated cocaine-induced 50-kHz ultrasonic vocalization in rats. **Addiction**

Biology, v. 27, n. 1, p. 1-8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ADB.13084>. Acesso em: 10 nov. 2022

SORDO, L. *et al.* A systematic review of evidence on the association between cocaine use and seizures. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 133, n. 3, p. 795-804, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.08.019>. Acesso em: 26 set. 2022.

SOUZA, D. F. B. de; DUNNINGHAM, W. A.; SENA, E. P. de. As bases farmacológicas do uso de modafinila no tratamento do transtorno por uso de substância psicoativa - cocaína psychoactive substance use disorder – cocaine. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 22, n. 3, p. 273–301, 2018. Disponível em: <https://www.revneuropsiq.com.br/rbnp/article/download/434/169>. Acesso em: 26 set. 2022.

SOUZA, M. F. *et al.* Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 6, p. 505-514, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20143627>. Acesso em: 03 jan. 2023.

TERKEL, J.; DAMASSA, D. A.; SAWYER, C. H. Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. **Hormones and Behavior**, v. 12, n. 1, p. 95-102, 1979. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(79\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0018-506x(79)90029-1). Acesso em: 20 fev. 2023.

UNODC. UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **World Drug Report: executive summary, conclusions and policy implications**. ed. 21. Sales: United Nations publication, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4324/9780429269486-6>. Acesso em: 28 nov. 2022.

VOLKOW, N. D.; KOOB, G. F.; McLELLAN, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 4, p. 363–371, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmra1511480>. Acesso em: 12 jan. 2023.

WEI, C.; ANTHONY, J. C. LU, Q. Genome-environmental risk assessment of cocaine dependence. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 83, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00083>. Acesso em: 06 set. 2022.

WISE, R. A. The neurobiology of craving: Implications for the understanding and treatment of addiction. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 97, n. 2, p. 118–132, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1037//0021-843x.97.2.118>. Acesso em: 11 dez. 2022.

WÖHR, M. Ultrasonic communication in rats: appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 72, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2427-9>. Acesso em: 17 dez. 2022.

WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and Tissue**

Research, v. 354, p. 81–97, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00441-013-1607-9>. Acesso em: 28 nov. 2022.

WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 310-330, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.310>. Acesso em: 28 nov. 2022.

ZHANG, T. *et al.* Maternal programming of defensive responses through sustained effects on gene expression. **Biological Psychology**, v. 73, n. 1, p. 72-89, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.01.009>. Acesso em: 28 nov. 2022.

ZHANG, T. Y. *et al.* Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 1493-1502, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3293-04.2005>. Acesso em: 28 nov. 2022.