

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELLYNE DE CASTRO VIEIRA

USO DO MONITOR DE PADRÃO COMPORTAMENTAL ASSOCIADO A
DIFERENTES MODELOS DE MANIA: AVALIANDO O PERFIL DE
COMPORTAMENTO TIPO MANÍACO E EMISSÃO DE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS DE 50HKZ EM RATOS MACHOS E FÊMEAS.

CURITIBA

2023

KELLYNE DE CASTRO VIEIRA

USO DO MONITOR DE PADRÃO COMPORTAMENTAL ASSOCIADO A
DIFERENTES MODELOS DE MANIA: AVALIANDO O PERFIL DE
COMPORTAMENTO TIPO MANÍACO E EMISSÃO DE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS DE 50HKZ EM RATOS MACHOS E FÊMEAS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, Área de concentração Neurociências, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Co-orientadora: Dra. Camila Pasquini de Souza

CURITIBA

2023

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

Vieira, Kellyne de Castro

Uso do monitor de padrão comportamental associado a diferentes modelos de mania: avaliando o perfil de comportamento tipo maníaco e emissão de vocalizações ultrassônicas de 50HKZ em ratos machos e fêmeas/ Kellyne de Castro Vieira. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Prof. Dr. Roberto Andreatini.

Coorientadora: Dra. Camila Pasquini de Souza

1. Monitor de padrão comportamental. 2. Vocalizações ultrassônicas. 3. Vocalização de 50kHz. I. Andreatini, Roberto, 1961. II. Souza, Camila Pasquini de, . II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Camila de Souza Dorneles CRB-9/2056



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 **KELLYNE DE CASTRO VIEIRA** intitulada: **Uso do Monitor de Padrão Comportamental associado a diferentes modelos de mania: Avaliando o perfil de comportamento tipo maniaco e emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratos machos e fêmeas.**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO ANDREATINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 19 de Dezembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/12/2023 16:10:05.0

ROBERTO ANDREATINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/12/2023 16:18:29.0

LUIZ KAE SALES KANAZAWA

Avaliador Externo (55001467)

Assinatura Eletrônica

21/12/2023 17:32:42.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (04) 1336-11693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 333318

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 333318

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Professor Doutor Roberto Andreatini pela grande oportunidade de aprender ao seu lado, pela orientação que nos estimula ao nosso melhor, ao mesmo tempo que é cheia de humanidade. Obrigada por toda ajuda e paciência professor, a você toda minha gratidão e admiração.

À Doutora Camila Pasquini de Souza, um agradecimento especial: Minha co-orientadora e irmã de laboratório que me adotou e me ensinou tanto desde o início, uma grande profissional e grande amiga, não teria conseguido sem sua ajuda. Obrigada por tudo!

À professora Maria Vital, que inicialmente seria minha orientadora, que sempre me acolheu quando precisei, me estimulando mesmo que não tenhamos continuado nosso projeto juntas.

Aos professores da banca por terem aceitado este convite, suas sugestões e discussões sempre são ricas, obrigada por compartilharem sua sabedoria comigo.

À todos os professores do programa, que de alguma forma contribuíram com seu conhecimento nessa jornada, sempre abertos ao diálogo e as discussões. Este período foi muito rico para mim.

Aos meus pais: Tudo o que vocês fizeram por mim me trouxe até aqui e cada conquista minha sempre é de vocês também. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me apoiarem, amo vocês.

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo, Davi. A vida compartilhada com você é leve, obrigada por ser tão bom pra mim.

Aos meus amigos por todo incentivo e paciência durante esse período, que sigamos compartilhando nossas vitórias.

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.

(Carl Sagan)

RESUMO

Os modelos animais são muito úteis para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas, como foi o caso dos antidepressivos. No entanto, os modelos animais de mania ainda estão em fase inicial de desenvolvimento. O monitor de padrão comportamental (BPM) é capaz de detectar comportamentos tipo maníacos e efeitos antimaníacos em camundongos com atividade reduzida do transportador de dopamina (DAT). Recentemente, um aumento nas vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (“apetitivas”) foi proposto como um novo índice para comportamento maníaco em ratos. Assim, o objetivo do presente estudo foi estudar o perfil de BPM e emissão das USV de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes modelos animais de mania (anfetamina, modafinila e privação de sono). Ratos machos e fêmeas adultos foram submetidos à administração aguda de DL-anfetamina na dose de 5 mg/kg ou modafinila na dose de 150 mg/kg, ambos ip. Outro grupo foi submetido a 24 horas de privação de sono. Imediatamente após a intervenção, os ratos foram colocados no aparelho BPM com registro simultâneo das USV. A DL-anfetamina aumentou a distância, a velocidade e os *hole pokes* em ambos os sexos, sem alterar a emissão de USV de 50 kHz. Modafinila reduziu distância e velocidade em ratos machos. A privação de sono levou a um aumento das USV de 50 kHz, apenas em ratos machos. Foi observado dimorfismo sexual tanto nos modelos de modafinila quanto de privação de sono, bem como os perfis inerentemente diferentes exibidos nos modelos utilizados. Esses fatores devem ser levados em consideração ao resumir os dados para um potencial medicamento antimaníaco ou para construir uma hipótese neurobiológica do estado maníaco. No geral, os presentes resultados sugerem que, para ratos, a adição do registro de USV ao BPM não nos mostrou um aumento do perfil de comportamento maníaco, sendo necessário incluir algumas mudanças adicionais no modelo.

Palavras-chave: Monitor de padrão comportamental; mania; vocalizações ultrassônicas; vocalização de 50kHz.

ABSTRACT

Animal models are very useful for the development of new therapeutics as was the case for antidepressants. Yet, animal models of mania are still in early stage of development. The behavioural pattern monitor (BPM) is able to detect manic-like behaviour and antimanic-like effects in mice with reduced dopamine transporter (DAT) activity. Recently, an increase in 50 kHz (“appetitive”) ultrasonic vocalizations has been proposed as a new index for manic-like behaviour in rats. Thus, the aim of the present study was to study the BPM profile and USV emission of male and female rats submitted to different animal models of mania (amphetamine, modafinil and sleep deprivation). Adult male and female rats were submitted to DL-amphetamine acute administration at the dose of 5 mg/kg or modafinil at 150 mg/kg, both ip. Another group was submitted to 24h of sleep deprivation. Immediately after intervention, the rats were placed in the BPM apparatus with concurrent USV recording. DL-amphetamine increased distance, velocity, and hole pokes in both sexes, without changing 50 kHz USV emission. Modafinil reduced distance and velocity in male rats. Sleep deprivation led to an increase in USV of 50 kHz, only in male rats. It was observed sexual dimorphism in both the modafinil and sleep deprivation models, as well as the inherently different profiles exhibited in the models utilized. These factors should be taken in consideration when summarizing the data for a potential antimanic drug or for construct neurobiological hypothesis of the manic state. Overall, the present results suggest that, for rats, the addition of USV recording to BPM, did not show us an increase of the manic-like behaviour profile, being necessary to include some additional changes in the model.

Keywords: Behavioural pattern monitor; mania; ultrasonic vocalizations; 50 kHz vocalization subtype.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vocalizações ultrassônicas (USV) de ratos adultos.....	19
Figura 2: Ilustração Monitor de Padrão Comportamental (BPM).....	26
Figura 3: Posicionamento de microfone ultrassônico.....	26
Figura 4: Aparato de privação de sono.....	28
Figura 5: Fases ciclo estral de ratas.....	29
Figura 6: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) em ratos.....	31
Figura 7: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) em ratas.....	32
Figura 8: Efeito da DL-anfetamina na atividade locomotora em ratos.....	33
Figura 9: Efeito da DL-anfetamina na atividade locomotora em ratas.....	33
Figura 10: Efeito da Modafinila (150 mg/kg, ip) em ratos.....	34
Figura 11: Efeito da Modafinila (150 mg/kg, ip) em ratas.....	35
Figura 12: Efeito da Modafinila na atividade locomotora em ratos.....	36
Figura 13: Efeito da Modafinila na atividade locomotora em ratas.....	36
Figura 14: Efeito da Privação de sono (24 horas) em ratos.....	37
Figura 15: Efeito da Privação de sono (24 horas) em ratas.....	38
Figura 16: Efeito da Privação de sono na atividade locomotora em ratos.....	39
Figura 17: Efeito da Privação de sono na atividade locomotora em ratas.....	39
Figura 18: Perfil de USV/10 min em machos.....	40
Figura 19: Perfil de USV/10 min em fêmeas.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fases do ciclo estral após BPM.....	42
Tabela 2: Resumo dos resultados comportamentais.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACC	- Córtex singulado anterior
AMPH	- Anfetamina
BPM	- <i>Behaviour pattern monitor</i>
CEUA/BIO	- Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas
DAT	- Transportador de Dopamina
IP	- Intraperitoneal
KD	- <i>Knockdown</i>
KD-DAT	- <i>Knockdown</i> para o transportador de dopamina
MOD	- Modafinila
PFC	- Córtex pré-frontal
PRIV	- Privação de sono
REM	- <i>Rapid eye movement</i>
TB	- Transtorno bipolar
USV	- Vocalizações ultrassônicas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Neurobiologia do tb.....	14
1.2 Tratamento farmacológico do TB.....	16
1.3 Modelos animais.....	16
1.3.1 Modelos farmacológicos.....	17
1.3.2 Modelos genéticos.....	18
1.3.3 Modelos ambientais.....	19
1.4 Vocalizações ultrassônicas e modelos de mania.....	20
1.5 Monitor de padrão comportamental.....	22
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Manipulação prévia (handling).....	26
4.3 Monitor de padrão comportamental.....	27
4.4 USV e análise.....	28
4.5 Intervenções.....	29
4.6 Privação de sono por plataforma única.....	30
4.7 Lavado vaginal.....	30
4.8 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 DL-Anfetamina alterou atividade locomotora e exploratória, mas não USV de 50kHz em machos e fêmeas.....	33
5.2. Modafinila diminuiu atividade locomotora apenas em ratos machos.....	36
5.3. Privação de sono aumentou USV de 50kHz em ratos machos.....	39
5.4. Perfil de USV de 50kHz por intervalo de tempo.....	42

5.5. Ciclo estral das ratas.....	44
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO.....	56

1. INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (TB) é uma desordem psiquiátrica caracterizada pela recorrência de episódios intercalados entre mania/hipomania, depressão e eutímia, podendo ter ainda flutuações suaves de humor entre estas. O surgimento dos sintomas se dá por volta do início da vida adulta, próximo aos 20 anos de idade, com uma prevalência de 2,4%, sendo um transtorno de caráter crônico. Tem sido observado uma diminuição da resposta ao tratamento ao longo do tempo, além da diminuição dos intervalos entre as duas crises, podendo ocorrer ainda comorbidade com alterações cardiovasculares, endócrinas e neuropsiquiátricas. O TB apresenta uma alta taxa de suicídio (cerca de 20 vezes mais alta do que a população em geral), sendo que até um terço desses pacientes fará pelo menos uma tentativa de suicídio, com 70% destas ocorrendo durante uma fase depressiva (Léda-Rêgo, 2020; Wohr, 2022; Young et al., 2011). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais os episódios de mania duram pelo menos 7 dias, enquanto os sintomas depressivos estão presentes em um período de pelo menos 14 dias (Valvassori et al., 2019).

A mania é descrita como um episódio de humor elevado, expansivo, irritável ou eufórico. A hiperatividade ocorre em até 90% dos episódios, sendo também frequente a diminuição de sono (83%) e o aumento da fala ou taquilalia (89%). Também pode ocorrer um aumento significativo de agitação psicomotora, de comportamentos impulsivos, aceleração do pensamento com fuga de ideias e distração, podendo ainda haver presença de psicose (Wohr, 2022; Young et al., 2011).

1.1 Neurobiologia do TB

Uma vez que a pluralidade dos sintomas clínicos indica que provavelmente o TB não está restrito a uma área específica do cérebro (contemplando alterações cognitivas, comportamentais, imunológicas, neuroendócrinas, etc), entende-se que se trata de uma disfunção de redes cerebrais interconectadas. Segundo essa perspectiva, há duas redes límbicas

pré-frontais envolvidas: A primeira inclui o córtex pré-frontal ventromedial (PFC), córtex cingulado anterior (ACC), núcleo accumbens, globo pálido e tálamo. Esse conjunto de regiões modula a resposta da amígdala a estados emocionais gerados endogenamente, como a melancolia (gerada por memórias anteriores). A segunda rede regulatória, envolve o córtex pré-frontal ventrolateral, médio e dorsal, córtex cingulado, estriado ventromedial, globo pálido e tálamo. O córtex pré-frontal dorsolateral com suas conexões com o ventrolateral é descrito como o ponto de origem do arco regulatório cognitivo. Já o córtex pré-frontal ventrolateral, modula estados emocionais gerados por fatores externos, auxiliando na regulação emocional e cognitiva e suprime o afeto desadaptativo. As duas redes em funcionamento conjunto regulariam as respostas da amígdala em situações emocionais complexas em pacientes saudáveis (Maletic, 2014).

Em pacientes com transtorno bipolar, anormalidades pré-frontais são encontradas. Estudos de imagem mostram alterações estruturais e funcionais no PFC ventromedial, comum em transtornos relacionados ao humor. No contexto do transtorno bipolar, essa alteração se reflete no comprometimento da facilidade de se adaptar a mudanças sociais e emocionais. Por exemplo, pacientes deprimidos têm homeostase emocional e endócrina prejudicada. O PFC ventrolateral também é fonte de regulação de feedback para núcleos monoaminérgicos do tronco cerebral, logo uma disfunção gera um mau funcionamento na neurotransmissão (Maletic, 2014).

A distribuição das vias dopaminérgicas é composta pela via tuberoinfundibular (presente no hipotálamo modulando funções da hipófise anterior), nigroestriatal (regula funções do sistema motor), mesolímbica e mesocortical. Em conjunto, são responsáveis pela modulação da impulsividade, atenção, busca por recompensa, memória e processamento emocional. Tem sido investigada a participação dessas vias na mania dentro do TB, principalmente pela eficácia na clínica de medicamentos que interferem na neurotransmissão dopaminérgica, como os antagonistas D2 como risperidona e haloperidol (Bastos, 2015; Cipriani et al., 2011).

Outras evidências que suportam a participação de um aumento da transmissão dopaminérgica na mania são o aumento da densidade de receptores D2 nos núcleos caudado e putâmen em pacientes em mania, a

indução de mania/ hipomania pela administração de fármacos dopaminérgicos (p.ex., agonistas DA e psicoestimulantes) e a redução de alterações maníacas pela redução da síntese de dopamina pela depleção de tirosina da dieta ou pela administração de alfa-metil-p-tirosina, um inibidor da síntese de dopamina (Ashok et al., 2017).

1.2. Tratamento Farmacológico do TB

Os objetivos da terapia farmacológica são conseguir melhorar uma crise aguda, ao mesmo tempo que previne a recaída entre os episódios maníacos e depressivos. Os estabilizadores de humor como lítio, ácido valpróico e carbamazepina são considerados medicamentos essenciais para o tratamento do TB, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estudos de meta-análise reforçam o uso destes fármacos na mania (p.ex., Cipriani et al., 2011). Porém, apesar de melhorarem o prognóstico do TB, parcela significativa dos pacientes apresenta baixa responsividade ao tratamento isolado, sendo utilizadas concomitantemente, como adjuvantes, outras classes de fármacos como os antipsicóticos como risperidona, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e aripiprazol. Apesar do seu uso já estabelecido na clínica, os antimaníacos atuais apresentam efeitos adversos significativos que reduzem a adesão ao tratamento (Cipriani et al., 2011). Além disto, excetuando-se o lítio, os fármacos utilizados no tratamento do TB foram desenvolvidos com outra finalidade terapêutica (p.ex., antipsicóticos para esquizofrenia e anticonvulsivantes para a epilepsia). Portanto, os tratamentos que temos são limitados e inespecíficos, sendo necessária a investigação de novos fármacos para o tratamento do TB, além de identificar os processos neurobiológicos subjacentes aos episódios maníacos (Bastos, 2015).

1.3. Modelos Animais

Os modelos animais são ferramentas valiosas para o estudo da base do mecanismo neurobiológico de doenças e para avaliação de novas estratégias de tratamento, sendo considerado um bom modelo, quando preenche os seguintes

critérios de validade: de face, de construto e preditiva. A validade de face se refere ao modelo conseguir mimetizar as mudanças comportamentais nos animais, enquanto a de construto refere-se às alterações fisiopatológicas, e a preditiva é quando o modelo prediz algum evento da clínica (p.ex., os fármacos que são utilizados para prevenir ou tratar determinada doença, devem apresentar uma mesma alteração comportamental ou fisiológica no modelo). No Transtorno Bipolar, como existe a alteração de episódios maníacos e depressivos, ainda não temos modelos animais bem validados que consigam acompanhar a virada de uma crise, conseguindo apenas investigar separadamente os estados de mania e depressão (de Miranda et al., 2017).

A maioria dos modelos animais para TB, induzem comportamentos ou maníacos ou depressivos, mas não uma combinação. A ouabaína é um inibidor de Na⁺/K⁺-ATPase, capaz de aumentar locomoção em ratos, associado com comportamento maníaco. Quando administrado via intracerebroventricular, por vez, induz hipolocomoção nos animais, considerado um comportamento tipo depressivo. Valvassori e colaboradores em 2019 realizaram um protocolo avaliando seu efeito após 7, 9 e 14 dias após a administração, conseguindo simular os dois episódios de humor no mesmo animal, sendo uma proposta de modelo promissora.

1.3.1. Modelos farmacológicos:

Os modelos farmacológicos se baseiam inicialmente no critério observacional (validade de face). Por exemplo, os psicoestimulantes como a anfetamina, conseguem induzir comportamentos tipo maníacos em indivíduos saudáveis ou desencadear episódios maníacos em pacientes com TB, acarretando também hiperatividade e outros comportamentos tipo maníacos em ratos e camundongos (Young et al., 2011; Einat, 2007; Ashok et al., 2017; de Miranda et al., 2017). Porém este modelo é limitado, uma vez que a hiperatividade gerada pelas anfetaminas em roedores também é utilizada como variável em modelos de abuso de drogas e esquizofrenia (p.ex., Levis et al., 2022). Além disto, a hiperatividade, variável frequentemente utilizada isoladamente, é apenas uma das alterações da mania, podendo mesmo estar

ausente em alguns pacientes (Young et al., 2011). Além da anfetamina, inibidores do transportador de dopamina (DAT) também são usados em modelos farmacológicos de mania como por exemplo a modafinila, um inibidor fraco de DAT usado na clínica para tratamento de narcolepsia, e o GBR12909, um inibidor seletivo do DAT (van Enkhuizen et al., 2013). A indução de hiperlocomoção por cetamina, um antagonista dos receptores NMDA do glutamato, também tem sido proposta como um modelo de mania. Em todos estes modelos farmacológicos, fármacos antimaniacos (p.ex. lítio, valproato ou antipsicóticos) são eficazes em reduzir a hiperlocomoção, conferindo validade preditiva aos modelos (El-Mallakh et al., 2006; Young et al., 2011; de Miranda et al., 2017; Valvassori et al., 2017; Kwiatkowski et al., 2019).

1.3.2. Modelos genéticos:

Há diversas propostas de manipulação genética que poderiam servir como modelos de mania, sendo relacionados a potenciais mecanismos subjacentes da doença. Os exemplos incluem genes que foram associados com TB, como CLOCK ou DAT, encontrado em níveis diminuídos nesses pacientes. Camundongos geneticamente modificados para ter uma expressão menor de DAT (10% em comparação aos *wild type*), ou seja, knockdown (KD) para DAT exibem um padrão de comportamento maníaco como aumento de exploração e comportamento de risco (Young et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2019).

O gene CLOCK, relacionado ao ritmo circadiano, também pode estar associado ao TB: Ratos com mutação deste gene exibem padrão comportamental semelhante à mania, com presença de hiperatividade e diminuição de sono. Fármacos antimaniacos (lítio, valproato e antipsicóticos) revertem os comportamentos tipo maníacos em camundongos KD-DAT (Kwiatkowski et al., 2019) e mutante para o gene CLOCK (Roybal et al., 2007; Logan et al., 2021).

1.3.3. Modelos ambientais:

A interrupção do sono é um dos prelúdios mais significantes em relação aos episódios maníacos em pacientes com TB, também sendo um dos fatores mais frequentemente associados ao desencadeamento de episódios maníacos, possuindo, portanto, grande relevância clínica.

O modelo de privação de sono induz mudanças comportamentais temporárias como aumento da atividade locomotora, hipersexualidade, aumento de agressividade, além de poder apresentar comportamentos estereotípicos (Gessa et al., 1995; Abrial et al., 2015; Wendler et al, 2019). Esse conjunto de comportamentos maníacos tem o ápice entre 30 e 40 minutos após o término da privação de sono (retirada da plataforma), sendo um intervalo ideal para realização dos testes. Gessa et al. (1995) observaram que ratos tratados com lítio pelo período de 10 dias apresentaram hiperatividade motora e latência para adormecer em comparação com ratos privados de sono por 72 horas. A administração de haloperidol na última hora de privação de sono também interferiu na latência para o sono, indicando que o modelo tem validade preditiva. A privação de sono de 24h também é capaz de induzir comportamentos tipo antimaníacos que são revertidos pela administração de lítio (Wendler et al., 2019). Foi proposto por Tufik e colaboradores em 1981 que este modelo em plataforma induziria uma sensibilidade dos receptores dopaminérgicos, sendo demonstrado em estudos posteriores, um aumento da densidade tanto de receptores D1 quanto D2, inclusive aumento efeitos comportamentais induzidos por psicoestimulantes (Berro, 2014).

A limitação de tal modelo seria que além do estresse induzido nos animais, também ocorrem outras interferências como isolamento social e imobilização (Young et al, 2011). Entretanto, se considerarmos que o estresse também pode estar relacionado ao episódio maníaco, estes fatores tornam-se interessantes para a validade de constructo do modelo.

1.4. Vocalizações ultrassônicas e modelos de mania

Assim como em outros distúrbios psiquiátricos, um modelo de mania ainda é um desafio a ser desenvolvido. Embora o aumento da atividade locomotora seja significativo, ele também é avaliado em modelos de esquizofrenia e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Uma característica mais específica para a mania em relação a esses outros modelos é o aumento da fala ou taquilalia (Goodwin and Jamison, 2007). Portanto, uma forma de translacionar esse comportamento para os modelos animais é através da análise da comunicação entre os roedores, o que pode ser realizado através captação e análise das vocalizações ultrassônicas (USV) dos roedores.

O rato é um animal frequentemente utilizado na pesquisa comportamental em transtornos neuropsiquiátricos, uma vez que possuem um amplo repertório comportamental para análise, incluindo as chamadas USV, que são sons emitidos pelo rato acima do limiar da audição humana (> 18 kHz). Atualmente as USV são consideradas como indicadores de um aspecto emocional do rato, estando presente em diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes situações sociais (Wohr and Schwarting, 2013; Simola and Granon, 2019; Brudzynski, 2021). Por exemplo, filhotes retirados do ninho (afastados da mãe), ratos jovens em comportamento de brincadeiras, ou até machos adultos expostos a fêmeas ou à situações de agressão. Em todas essas ocasiões são comuns uma alta emissão de USV, mas que podem diferir em relação a faixa de frequência, ao formato, entre outras características (Wohr and Schwarting, 2013).

As USV de ratos adultos são geralmente classificadas em 2 grandes grupos: as USV de 22 kHz, denominadas de aversivas, e as de 50 kHz, também denominadas de apetitivas (Wohr and Schwarting, 2013; Simola and Granon, 2019; Brudzynski, 2021). As USV aversivas (22 kHz), são as emitidas na faixa de 22 a 35 kHz, geralmente com duração maior que 300 milissegundos, com pouca ou nenhuma amplitude (apresentado uma forma achatada, Figura 1A) e estão geralmente relacionadas ao medo ou à ansiedade. Este tipo de USV é observada em situações como contato com um predador, luta com outros ratos, choque nas patas e até mesmo na abstinência de algumas drogas de abuso. Já as vocalizações apetitivas (50 kHz), são emitidas entre 35 e 80 kHz e são mais

curtas (30 a 40 milissegundos), com ou sem amplitude (figura 1B) e estão presentes em situações consideradas apetitivas, como na interação social com brincadeiras ou acasalamento, sendo associadas ao bem-estar do animal. Também estão presentes após a administração de vários fármacos psicoestimulantes que aumentam a atividade dopaminérgica (Wohr and Schwarting, 2013; Simola and Granon, 2019; Brudzynski, 2021).

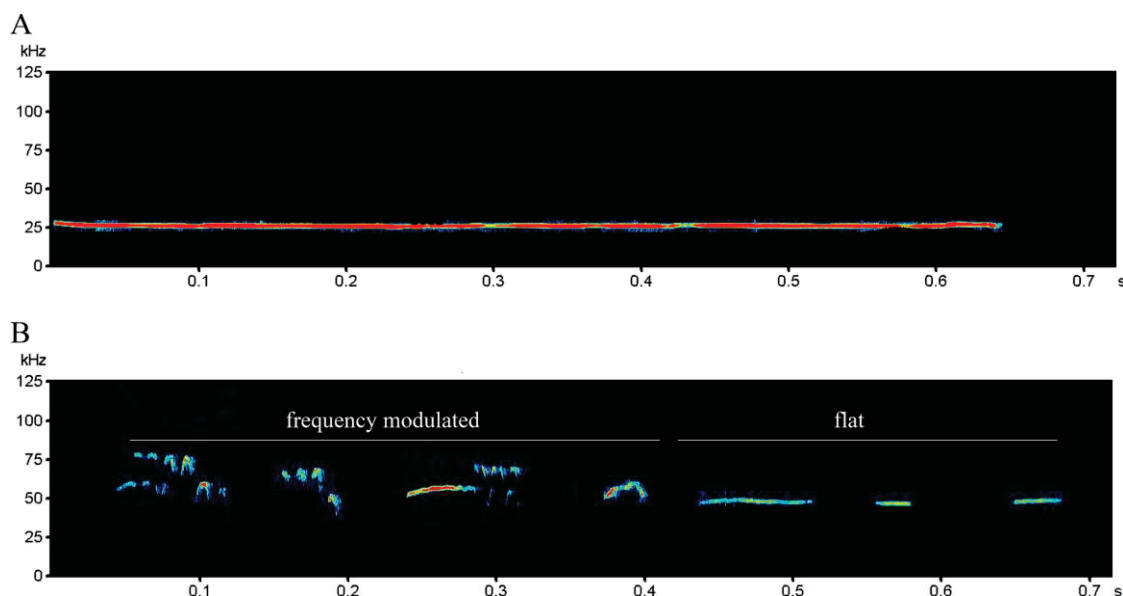


Figura 1 -Vocalizações ultrassônicas (USV) de ratos adultos. (A) USV de 22 kHz; (B) USV de 50 kHz (fonte: Simola e Granon, 2019)

Evidências sugerem que a emissão de vocalizações apetitivas de 50 kHz são em parte reguladas por neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, que vão da área tegmental ventral até o núcleo accumbens. Burgdorf e Panksepp (2006) observaram que lesões da área tegmental ventral (eletrolíticas ou com 6-hidroxidopamina) inibiram no rato a emissão de USV de 50 kHz provocadas por estimulação manual que simulam a interação social entre ratos (*tickling*), estímulo que normalmente provoca a emissão destas USV. Nesta linha, a estimulação elétrica da área tegmental ventral e do núcleo accumbens promovem robusta emissão das vocalizações apetitivas (Burgdorf et al., 2007). Drogas de abuso que alteram o sistema catecolaminérgico também promovem as USV de 50 kHz. Os psicoestimulantes no geral promovem esse efeito, mais especificamente a D-anfetamina, tanto quando administrada sistêmica ou localmente no N. accumbens (p.ex., Natusch and Schwarting, 2010; Pereira et

al., 2014; Mulvihill and Brudzynski, 2019). A D-anfetamina pode induzir até 100 USV apetitivas por minuto no pico de efeito da droga, sendo este efeito aumentado pelo uso de cepilho limpo na caixa experimental (Natusch and Schwarting, 2010). Esta emissão exacerbada pode refletir uma elevação de humor ou da comunicação, como na mania (Pereira et al., 2014; de Miranda et al., 2017; Wendler et al., 2019; Wöhr, 2022). Psicoestimulantes com efeitos diretos na liberação de catecolaminas como a cocaína, metilfenidato, metanfetamina e mefedrona, por exemplo, também aumentam a emissão de USV de 50 kHz. Uma observação importante, é que a 3,4-metilenodioximetanfetamina, um psicoestimulante que tem maior efeito no sistema 5-HT e que também induz hiperlocomoção, não proporciona o mesmo aumento das USV de 50 kHz. Logo, mais uma evidência de que este aumento das USV de 50 kHz está ligado à neurotransmissão dopaminérgica (Wöhr, 2022).

1.5. Monitor do Padrão Comportamental (*Behavioral Pattern Monitor*)

O Monitor do Padrão Comportamental (*Behavioral Pattern Monitor*, BPM), é um aparato que permite uma avaliação conjunta e simultânea da atividade locomotora e da atividade exploratória, uma vez que permite análise do *rearing* (comportamento de levantar nas patas traseiras) e da exploração inserção do focinho nos orifícios (*hole poke*) do aparato. Inicialmente desenvolvido para análise dos efeitos de fármacos no comportamento de ratos, foi observado posteriormente que o BPM também é capaz de fornecer um padrão comportamental de camundongos com redução da atividade do DAT similar ao observado em pacientes com TB em fase maníaca (Perry et al., 2009; Kwiatkowski et al., 2019). Por exemplo, diversos estudos observaram que camundongos *knockdown* para DAT (KD-DAT) ou tratados com GBR12909 apresentam aumento de transições, do comportamento de *rearing* e de *hole poke*, quando comparados aos controles, isto é, camundongos selvagens ou tratados com veículo, respectivamente (Kwiatkowski et al., 2019). Mais ainda, Young et al. (2007), em estudo translacional com um BPM humano, observaram aumento da atividade locomotora e interação com objetos, além do padrão locomotor alterado característico, alterações similares aos camundongos

knockdown para DAT ou tratados com GBR12909. Esses estudos somam evidência da validade do aparato para avaliar os comportamentos tipo maníacos.

O BPM apresenta boa validade preditiva, uma vez que fármacos antimaníacos (lítio, valproato e antipsicóticos) são capazes de reduzir os comportamentos tipo maníacos em camundongos submetidos a modelos de mania, enquanto fármacos ineficazes (topiramato e Diazepam) apresentam resultados negativos (Young et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2019; Gonçalves et al., 2022).

Conforme descrito acima, o emprego do BPM e das USV de 50 kHz são estratégias úteis e válidas para avaliação dos comportamentos tipo maníacos e para avaliação de fármacos potencialmente úteis no tratamento da mania. Portanto, a inclusão das USV nos comportamentos avaliados no BPM é uma proposta muito promissora. Entretanto, psicoestimulantes não induzem aumento da emissão de USV apetitivas em camundongos (Serra et al., 2021), espécie utilizada nos estudos do BPM em modelos de mania (Kwiatkowski et al., 2019). Por outro lado, a avaliação conjunta das variáveis do BPM com as USV poderia ser estudada em ratos, abrindo a possibilidade de um modelo de mania que consiga abranger simultaneamente um conjunto maior de comportamentos significativos para a psicopatologia.

2. JUSTIFICATIVA

Os modelos de mania que temos disponíveis são limitados, uma vez que não são específicos para tal, incluindo hiperlocomoção induzida por estimulantes. A proposta desse projeto foi reunir este modelo já utilizado no BPM, um aparato desenvolvido para avaliar perfil comportamental de drogas, associado à emissão das vocalizações ultrassônicas dos animais, fazendo uma relação com um comportamento clínico relevante, aumento da fala, tendo como finalidade um modelo de mania mais completo e específico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar o perfil comportamental utilizando o BPM concomitantemente à emissão de USV de 50kHz de ratos machos e fêmeas submetidos a diferentes modelos animais de mania.

3.2 Objetivos específicos:

- Comparar o padrão de comportamento maníaco em diferentes modelos (anfetamina, modafinila e privação de sono)
- Avaliar a influência do dimorfismo sexual nos modelos propostos.
- Avaliar de forma conjunta os parâmetros de atividade locomotora (distância percorrida e velocidade), atividade exploratória (*hole pokes*) e emissão das USV de 50kHz.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foram avaliados 120 ratos Wistar, (60 machos e 60 fêmeas), com 75 a 90 dias de idade, provenientes do Complexo Biotério da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram agrupados em 4 em caixas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*, em ciclo claro/escuro 12:12 (luzes acesas das 07h às 19h), com exaustão e temperatura controlada (21+ 2°C).

Os ratos foram divididos randomicamente em 6 grupos experimentais: anfetamina (AMPH), modafinila (MOD) e privação de sono (PRIV), com n=10 ratos/grupo/ intervenção/ sexo, e seus respectivos controles (2 grupos veículos e 1 não privado, n=10/ grupo/ intervenção/ sexo). Considerando os dados de locomoção de estudos anteriores do laboratório (média do controle=30; média do grupo experimental= 100; DP=650), com erro tipo I de 5% e tipo II de 10%, o número de sujeitos calculado para cada grupo estimado pelo programa Statistica 12 (2014, Stat Soft Inc., Tulsa, EUA) foi de 10 ratos/ grupo/ sexo.

O presente projeto aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO), sob nº 1420 (anexo 1).

4.2. Manipulação Prévia (*Handling*)

Os ratos foram manipulados durante 5 minutos por 3 dias a fim de se adaptarem ao toque do experimentador e à manipulação, reduzindo a reação aversiva. Esta manipulação prévia foi realizada de acordo com o protocolo de Schwarting (2014), sendo a sequência:

- Dia 1: Deixar o animal percorrer à vontade durante metade do tempo, enquanto na segunda metade acariciá-lo ativamente.
- Dia 2: Exploração livre no primeiro minuto enquanto é acariciado. Durante os próximos 4 minutos, ele deve ser pego várias vezes para se habituar. Havendo a intenção da administração de drogas via ip., os animais também devem ser “picados” com uma caneta esferográfica para simular

tal ação. Ao pegar o animal, ele só deve ser solto após parar de tentar lutar, para que aprenda que esse movimento é ineficaz. Caso ele resista muito, deve-se tentar alisá-lo com a outra mão, a fim de acalmá-lo.

- Dia 3: Exploração livre no primeiro minuto enquanto é arranhado e acariciado. Durante os próximos 4 minutos, ele deve ser pego quatro vezes e cutucado na lateral 3 vezes consecutivas a fim de contê-lo. Só soltar o animal uma vez que houver parado de se debater.

Os animais foram pesados e tiveram seus rabos marcados com caneta para identificação no terceiro dia.

4.3. Monitor de Padrão Comportamental (BPM)

O aparato consiste em uma arena retangular (30.5 × 71 x 20 cm) de acrílico com fundo preto para contraste, com 10 orifícios de 2,5 cm de diâmetro, sendo 3 em cada parede mais longa, 1 em uma das paredes laterais e 3 no assoalho. Uma câmera é posicionada acima do aparato para gravação da sessão experimental, que foi analisado posteriormente pelo software Ethovision XT® (Noldus Information Technology, Holanda) para parâmetros de atividade locomotora (distância percorrida em cm e velocidade em cm/s) e exploratória (colocação do focinho em cada orifício, comportamento denominado *hole poke*). Cada rato foi colocado individualmente no aparato (no canto posterior do lado que não possui orifício), sendo mantido por 60 minutos com livre acesso a todo o aparato. O teste foi realizado com iluminação de 4 lux.

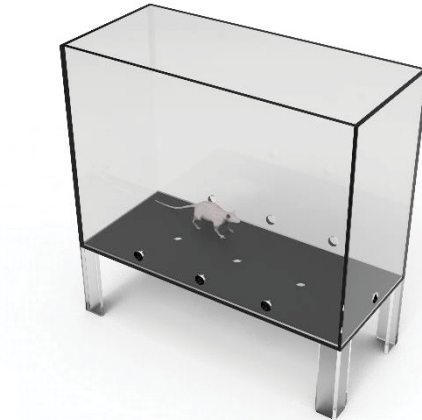


Figura 2: Ilustração Monitor de Padrão Comportamental (BPM). Esferas representam os orifícios laterais (7) e no assoalho (3). (Fonte: Acervo próprio).

4.4. USV e análise

As USV foram gravadas utilizando um sistema da Avisoft Bioacoustic (Avisoft, Alemanha), que consiste de microfone para sons ultrassônicos acoplado a um computador com programa Avisoft Recorder. O microfone utilizado foi o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16, sensível a frequências entre 15 e 180 kHz, colocado a 45 cm do chão da caixa para melhor captura acústica, conforme figura 3:

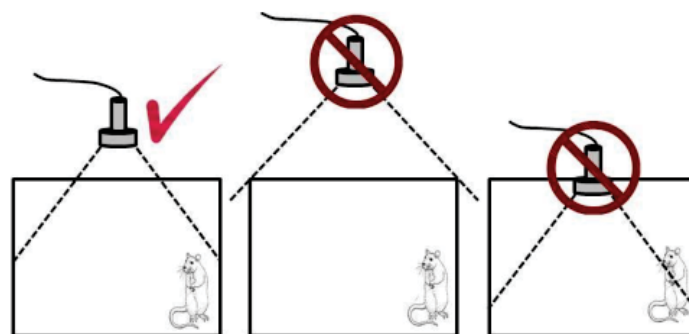


Figura 3: Esquema de posicionamento do microfone ultrassônico para captação das vocalizações ultrassônicas (USV) de ratos. O posicionamento correto está mostrado na ilustração à esquerda; na ilustração do centro o microfone está muito alto, podendo não captar as USV emitidas próximas ao assoalho, enquanto na ilustração à direita o microfone está muito baixo, podendo não captar as USV quando o animal levanta a cabeça (p.ex. no rearing). (Schwartzing, 2014)

As USV foram analisadas posteriormente utilizando-se o software Deep Squeak, um sistema baseado em *deep learning* para detecção e análises de vocalizações ultrassônicas (Coffey et al., 2019). Tal software, divide os arquivos de áudio em fragmentos e converte-os em sonograma, para que então as imagens geradas passem por um detector de objetos (rede neural convolucional regional). As detecções foram posteriormente analisadas com uma rede de *denoiser post-hoc* treinada pelo experimentador. Com isso, foi possível detectar automaticamente e distinguir USVs de ruídos (que comumente estão presentes neste tipo de arquivo). Finalmente, as USVs detectadas foram agrupadas manualmente em subtipos utilizando parâmetros de classificação relatados anteriormente com base na frequência, sendo classificadas em aversivas ou apetitivas (Clavero, 2020).

4.5. Intervenções

Os fármacos foram dissolvidos em salina, sendo DL- anfetamina (Sigma, EUA) administrada na dose de 5 mg/kg e a Modafanila (Stavigile® – Libbs, Brasil) na dose de 150 mg/kg, ambas por via intraperitoneal (ip). Estas doses foram baseadas em estudos anteriores indicando sua efetividade em eliciar aumento da atividade locomotora em ratos (Taylor and Snyder, 1971; Edgar and Seidel, 1997; Engelhardt et al., 2017). Os fármacos foram administrados agudamente, imediatamente antes do teste comportamental, em volume constante (1 ml/kg de peso). Já a privação de sono teve duração de 24 horas, com comida e bebida à vontade, sendo os ratos retirados do aparato e colocados imediatamente no BPM.

4.6. Privação de sono por Plataforma Única



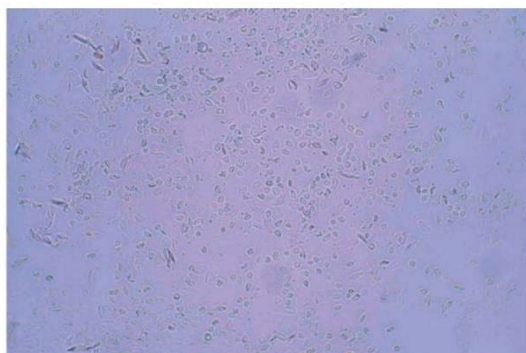
Figura 4 – Fotos dos aparatos para privação de sono. Esquerda: vista superior de um rato na plataforma (ração à esquerda, bebedouro retirado para realização da foto); Direita: foto de 3 aparatos (com bebedouros). (fonte Souza, 2018).

Os animais foram alocados isoladamente em uma plataforma cilíndrica com diâmetro de 6,5cm, dentro de uma caixa metálica (23x23x30cm) contendo água (1cm abaixo da altura da plataforma), durante o período de 24 horas (figura 4). Ao atingir o sono REM (*rapid eye movement*) ocorre atonia muscular, fazendo com que o rato entre em contato com água, acordando-o. Este modelo priva os ratos principalmente de sono REM, embora outras fases também podem ser afetadas (Machado et al., 2004). As caixas de privação de sono continham suporte com água e comida ad libitum, com temperatura da sala controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.7. Lavado vaginal

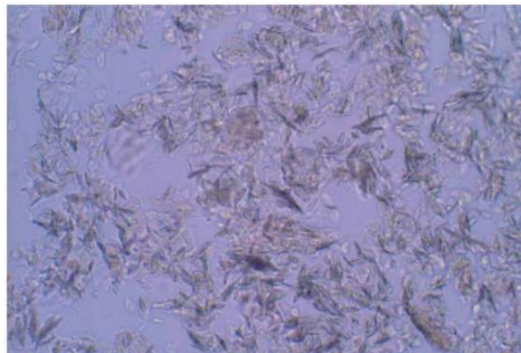
O ciclo estral pode ser dividido em 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro, sendo que essa variação é decorrente da flutuação hormonal que ocorre enquanto há atividade endócrina ovariana, se iniciando na puberdade da rata e finalizando na senectude, ao completarem aproximadamente um ano de vida (Vilela, 2007). O estudo da influência (ou não) do ciclo estral é importante para a

translação dos dados não-clínicos para a clínica, bem como pode auxiliar na compreensão da fisiologia/fisiopatologia do comportamento observado. Por exemplo, foi observado que ratas Wistar apresentam uma emissão maior de USV de 50 kHz na fase de pró-estro (Souza et al., 2018).



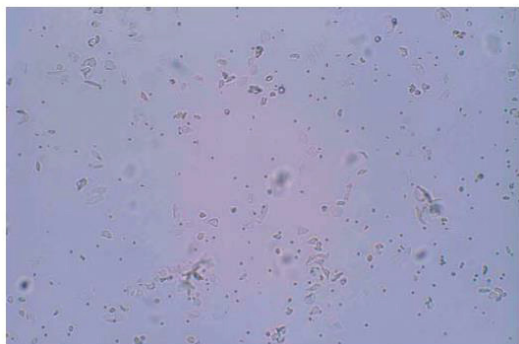
Proestro

Presença de células arredondadas, polinucleadas que podem estar dispersas ou agrupadas; Células epiteliais grandes; Ausência de neutrófilos.



Estro

Predomínio de células cornificadas; Queratinizadas; Aspecto de "folhas secas".



Metaestro

Predomínio de leucócitos com presença de células cornificadas e células epiteliais.



Diestro

Predomínio de leucócitos; presença de muco; poucas e pequenas células epiteliais.

Figura 5: Fases ciclo estral de ratas. Fotos representativas das diferentes fases do ciclo estral de ratas (Vilela, 2014)

Logo após serem retiradas do BPM, as ratas fêmeas passaram por coleta de lavado vaginal, a fim de se determinar a fase do ciclo estral e sua possível interferência nos comportamentos avaliados no teste. O lavado vaginal foi

coletado com o auxílio de um swab umedecido com solução de cloreto de sódio e em sequência feito esfregaço em lâmina de microscopia para visualização das células presentes, utilizando objetiva de 400x e classificando a da fase do ciclo conforme descrito na figura 5.

4.8. Análise estatística

Como machos e fêmeas foram testados em diferentes grupos experimentais, os dados foram analisados separadamente pelo teste t de Student (bicaudal) comparando os grupos experimentais (intervenção x não intervenção). Os dados que não se enquadravam nas suposições paramétricas foram analisados pelo teste de Mann Whitney. Todas as análises foram feitas no software Statistica 12.0. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 DL-Anfetamina alterou atividade locomotora e exploratória, mas não USV de 50kHz em machos e fêmeas

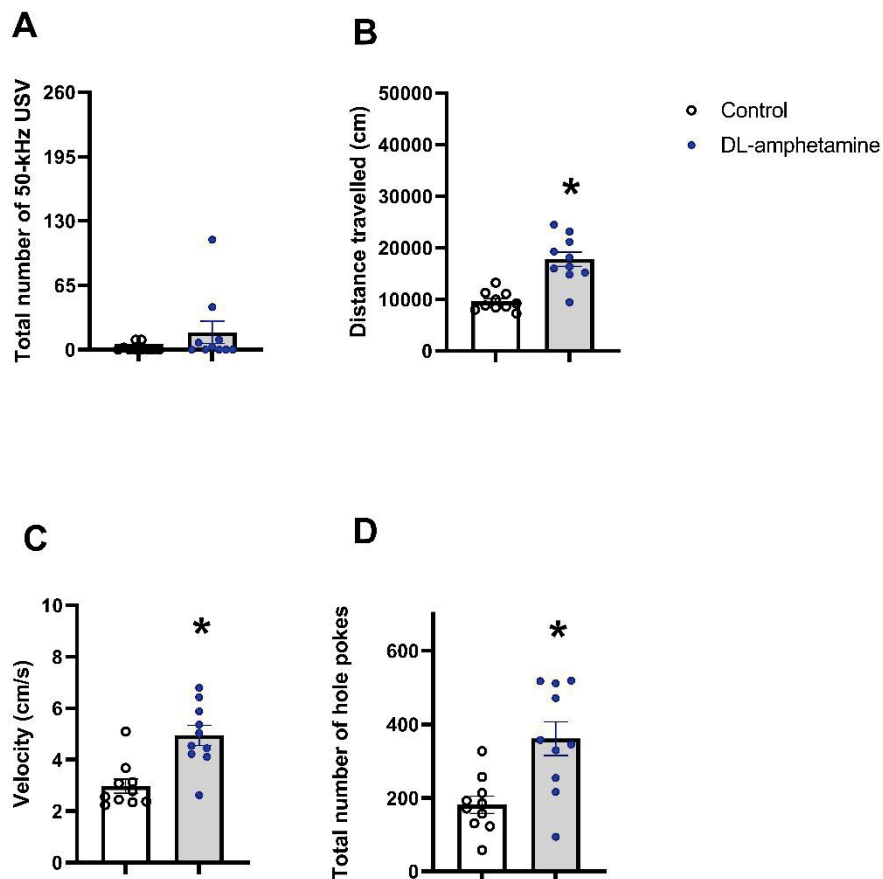


Figura 6: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) em ratos machos. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). *p<0,05.

Em ratos machos, a DL-anfetamina aumentou a distância percorrida (U= 4,00, p<0,001), velocidade (U= 4,00, p<0,001) e *hole pokes* (t18= 3,49, p<0,01), mas não induziu USV de 50 kHz (U=37,50, NS).

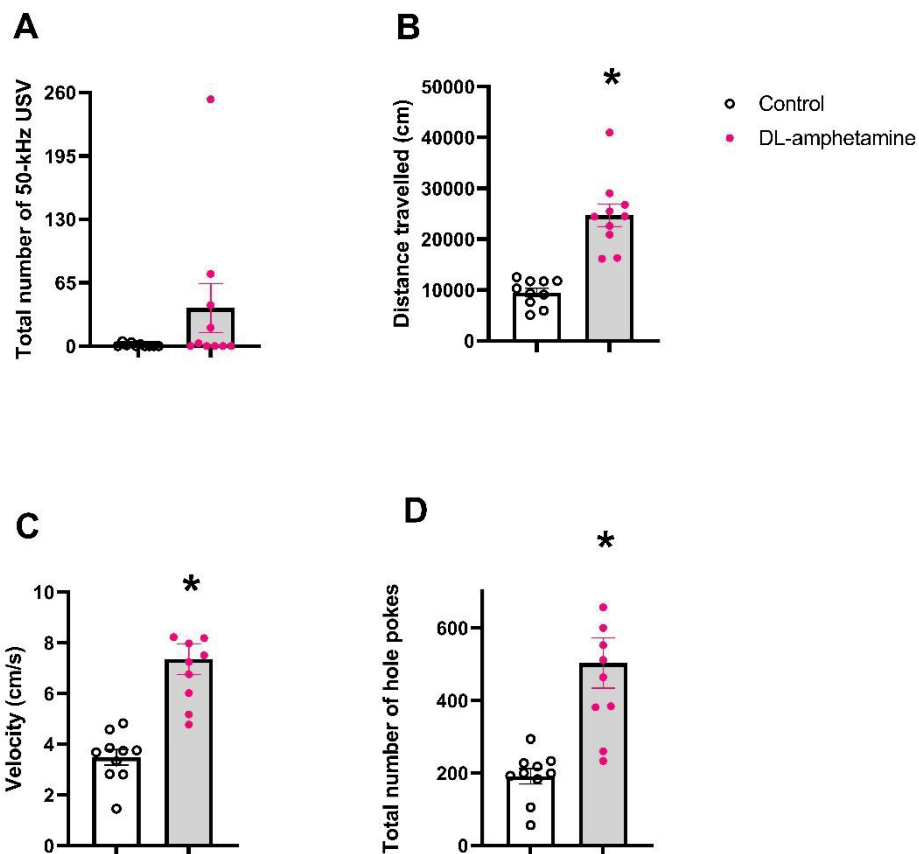


Figura 7: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) em ratas fêmeas. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$.

Em ratas, a DL-anfetamina aumentou a distância percorrida ($U=0,00$, $p < 0,001$), a velocidade ($U= 0,00$, $p < 0,001$) e os *hole pokes* ($U= 2,50$, $p < 0,001$). mas não induziu USV de 50 kHz ($U=37,00$, NS).

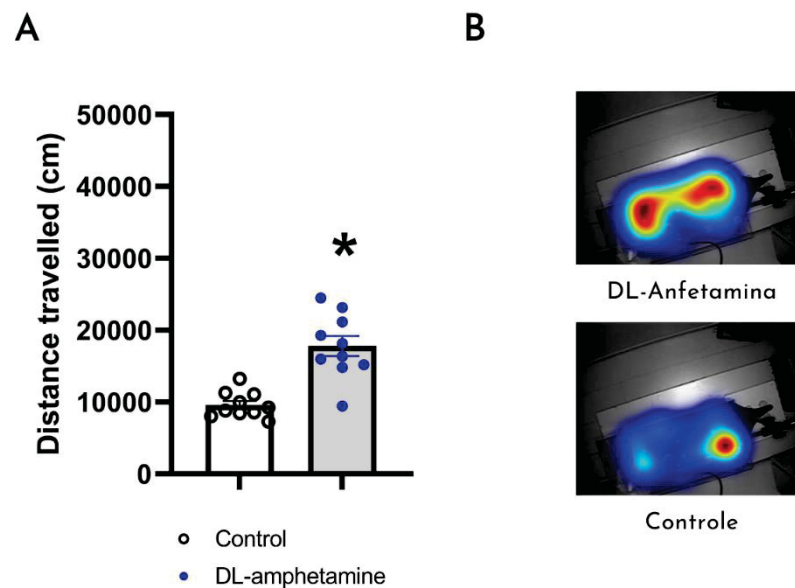


Figura 8: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) na atividade locomotora em ratos machos. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de DL-Anfetamina, enquanto abaixo, controle.

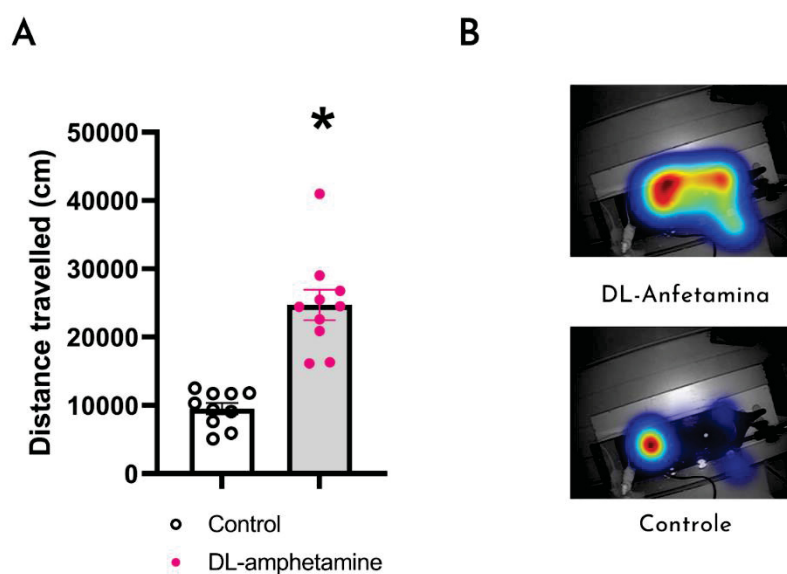


Figura 9: Efeito da DL-anfetamina (5 mg/kg, ip) na atividade locomotora em ratas fêmeas. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de DL-Anfetamina, enquanto abaixo, controle.

5.2. Modafinila diminuiu atividade locomotora apenas em ratos machos

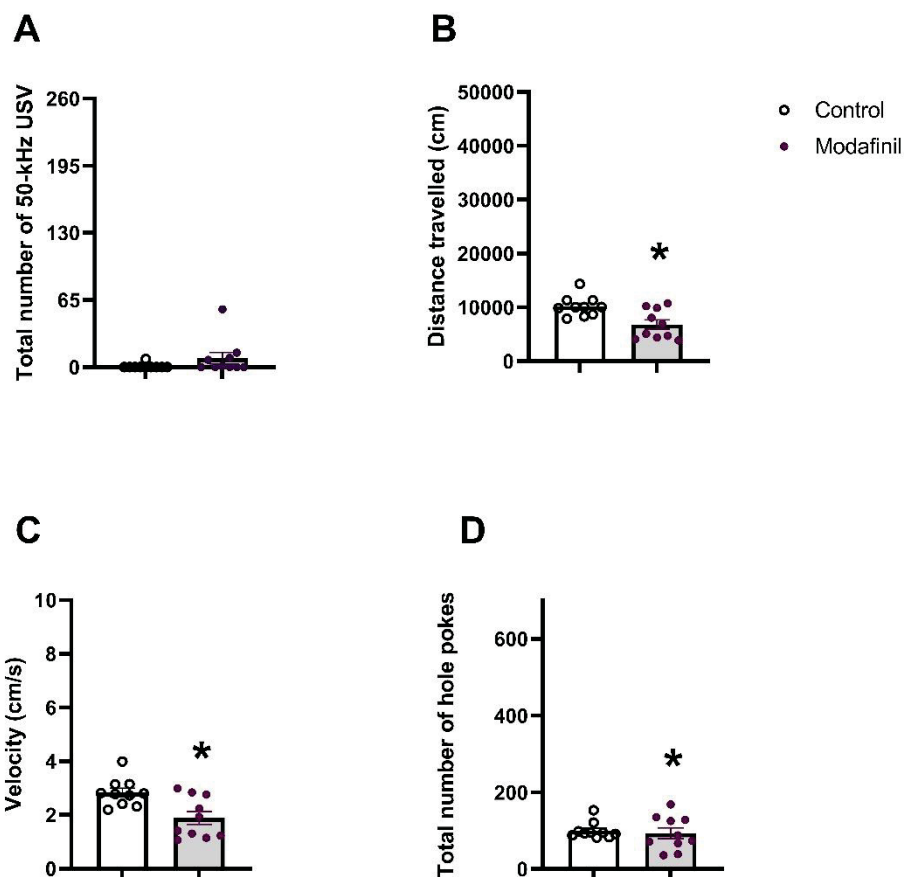


Figura 10: Efeito da Modafinila (150 mg/kg, ip) em ratos machos. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). *p<0,05.

Em ratos machos, a modafinila diminuiu a distância percorrida ($t_{18} = 3,23$, $p < 0,01$) e a velocidade ($t_{18} = 3,23$, $p < 0,01$), mas não aumentou os *hole pokes* ($U = 39,50$, NS) ou o USV de 50 kHz ($U = 29,50$, P).

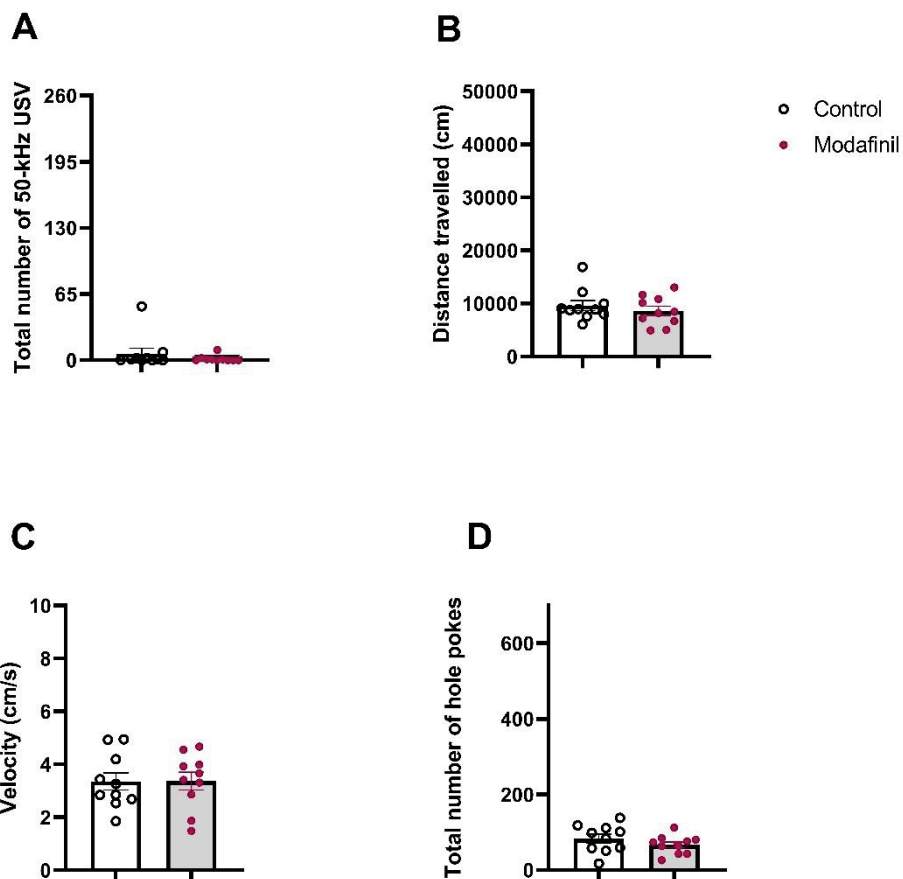


Figura 11: Efeito da Modafinila (150 mg/kg, ip) em ratas fêmeas. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). *p<0,05.

Nas fêmeas, a modafinila não alterou a distância percorrida ($t_{18} = 0,78$, NS), velocidade ($t_{18} = 0,78$, NS), *hole pokes* ($t_{18} = 1,21$, NS) ou USV de 50 kHz ($U = 16,50$, NS).

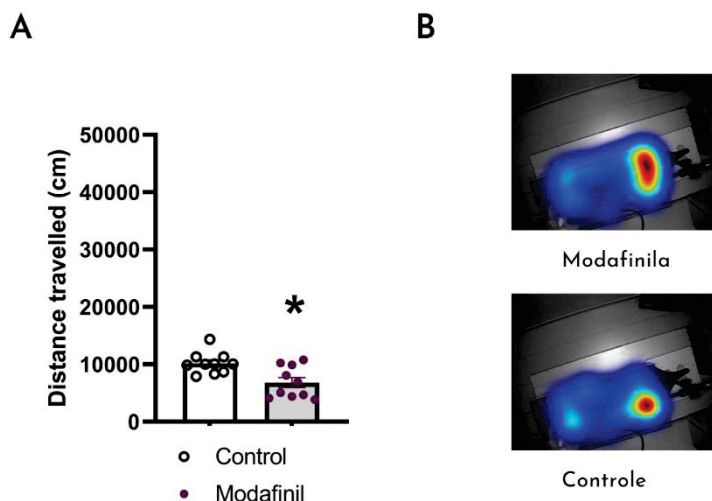


Figura 12: Efeito da modafinila (150 mg/kg, ip) na atividade locomotora em ratos machos. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de Modafinila, enquanto abaixo, controle.

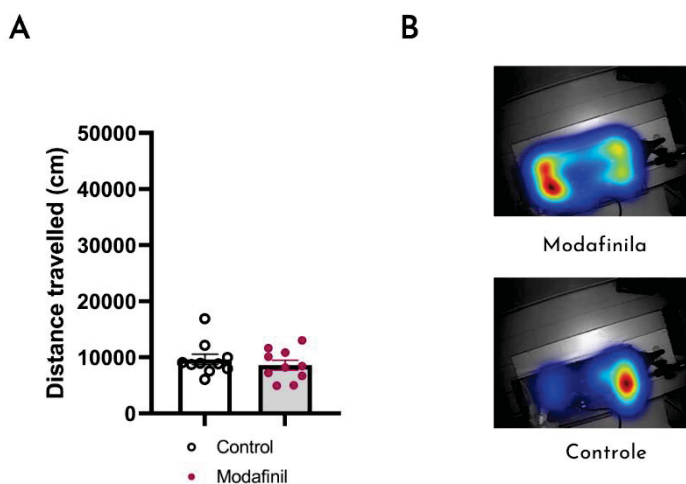


Figura 13: Efeito da modafinila (150 mg/kg, ip) na atividade locomotora em ratas fêmeas. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de Modafinila, enquanto abaixo, controle.

5.3. Privação de sono aumentou USV de 50kHz em ratos machos

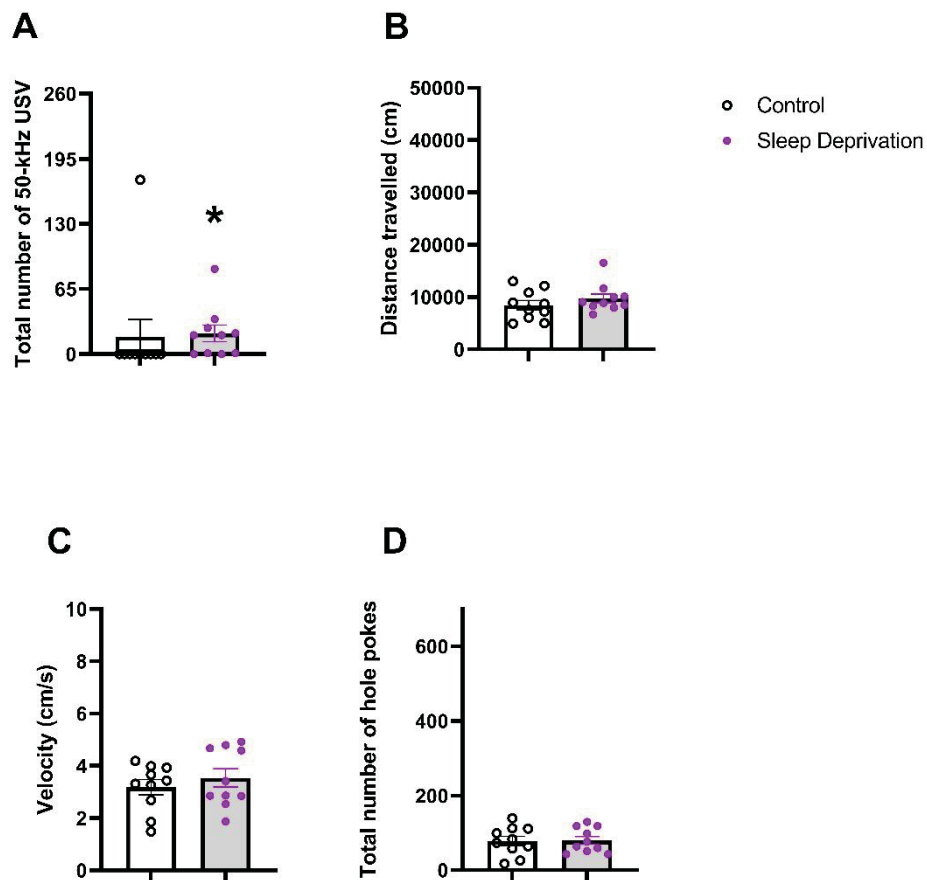


Figura 14: Efeito da Privação de sono (24 horas) em ratos machos. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$.

Em ratos machos, a privação de sono aumentou as USV de 50 kHz ($U=19,00$, $p < 0,05$), mas não alterou a distância percorrida ($t_{18} = -1,05$, NS), velocidade ($t_{18} = -1,05$, NS) ou *hole pokes* ($t_{18} = -0,10$, X).

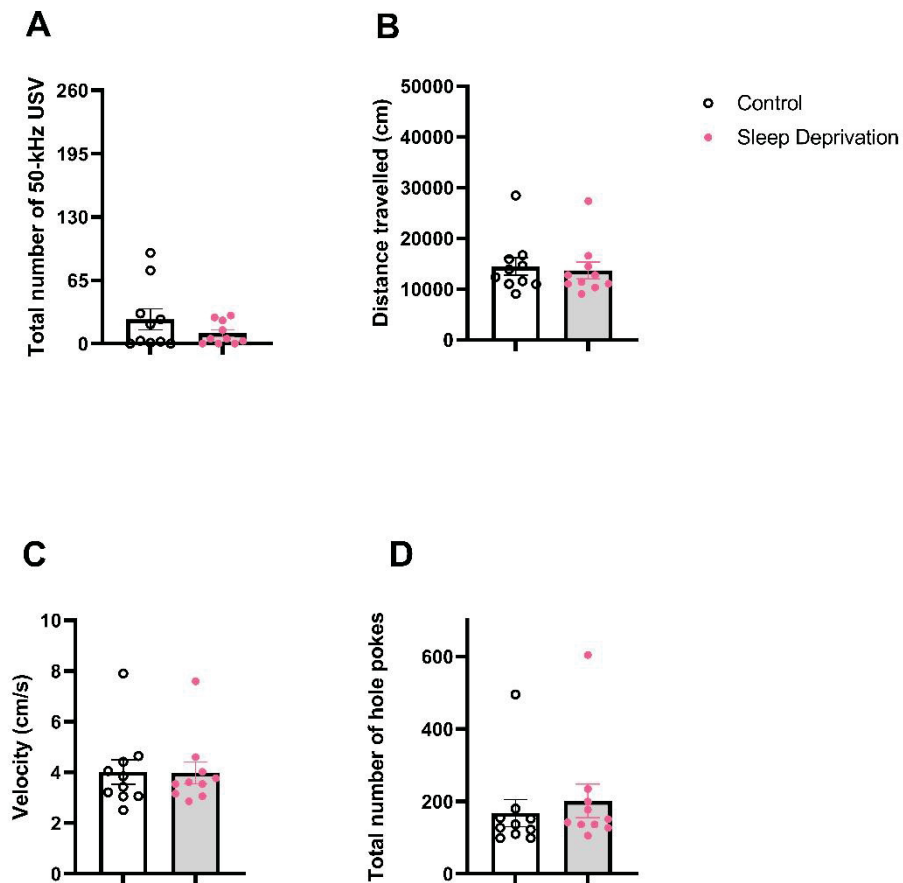


Figura 15: Efeito da Privação de sono (24 horas) em ratas fêmeas. (A) Número total de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz (USV). (B) Distância percorrida (em cm). (C) Velocidade dos animais (em cm/s). (D) Número total de *hole pokes*. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). *p<0,05.

Nas ratas, a privação de sono não alterou a distância percorrida ($t_{18} = 0,32$, NS), velocidade ($t_{18} = 0,32$, NS), *hole pokes* ($t_{18} = -0,56$, NS) ou USV de 50 kHz ($U = 42,50$, NS).

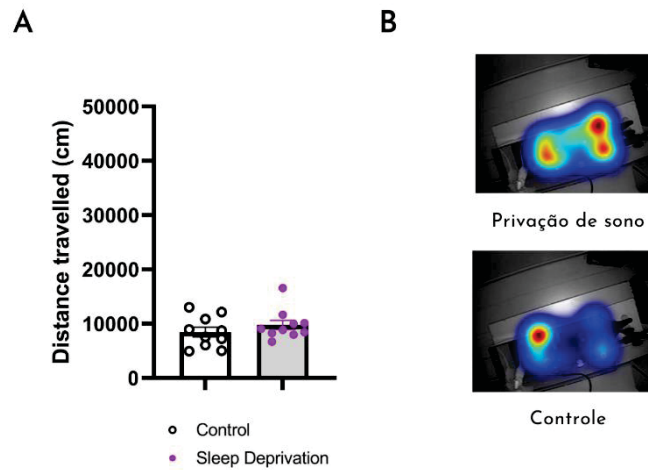


Figura 16: Efeito da privação de sono (24 horas) na atividade locomotora em ratos machos. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de Privação de sono, enquanto abaixo, controle.

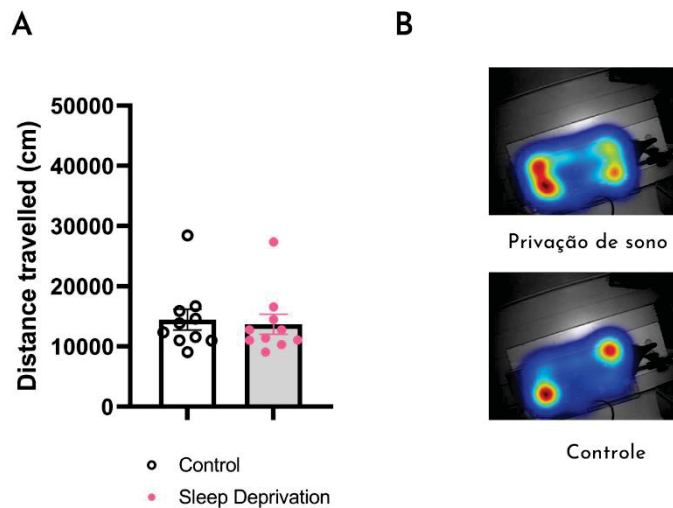


Figura 17: Efeito da privação de sono (24 horas) na atividade locomotora em ratas fêmeas. (A) Distância percorrida (em cm) Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$. (B) Exemplo representativo dos *heatmaps* gerados durante o teste: Imagem acima sendo o rato sob efeito de Privação de sono, enquanto abaixo, controle.

5.4. Perfil de USV de 50kHz por intervalo de tempo

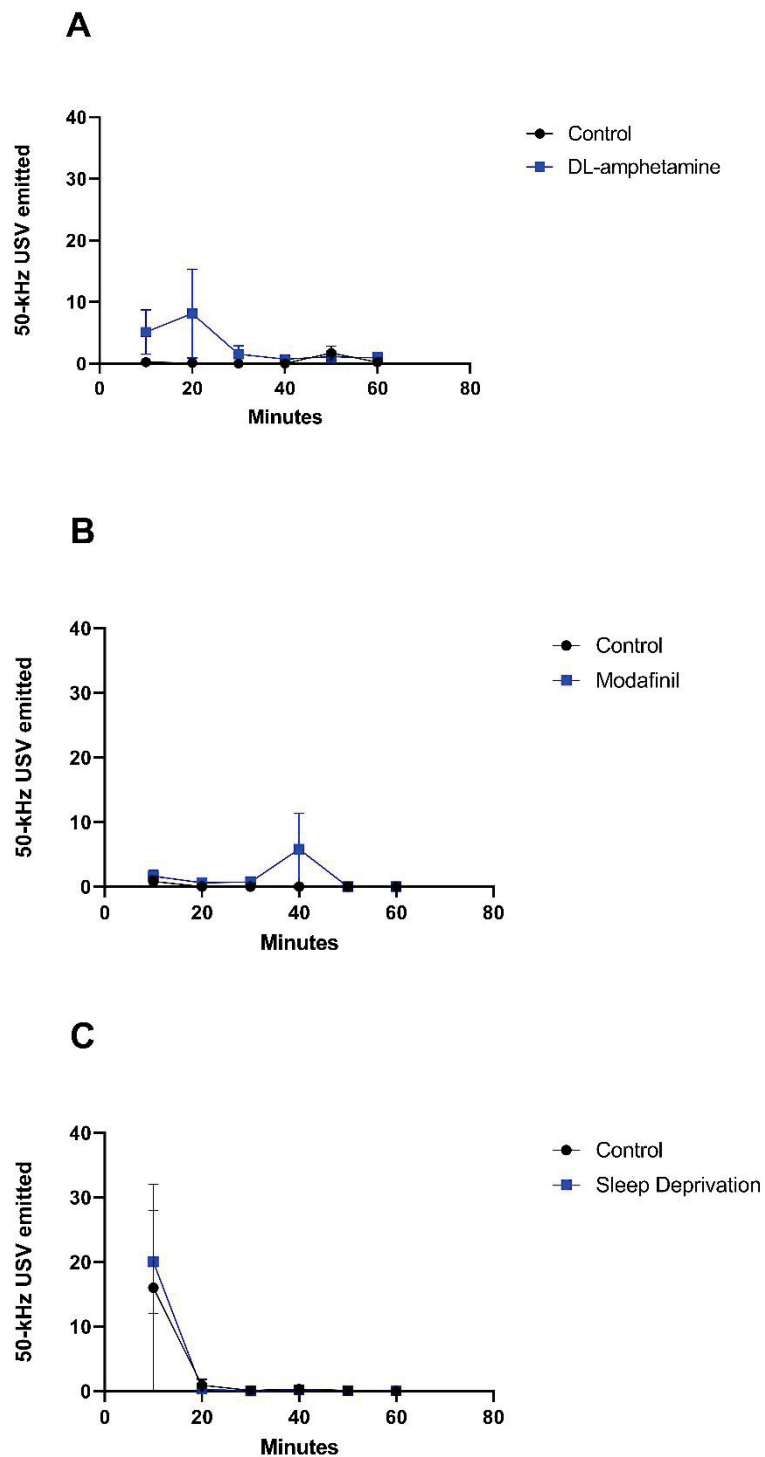


Figura 18: Perfil de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz emitidas em intervalos de 10 minutos em diferentes modelos de mania em ratos machos: (A) DL-Anfetamina 5mg/kg. (B) Modafinila 150mg/kg (C) Privação de sono 24 horas. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). * $p < 0,05$.

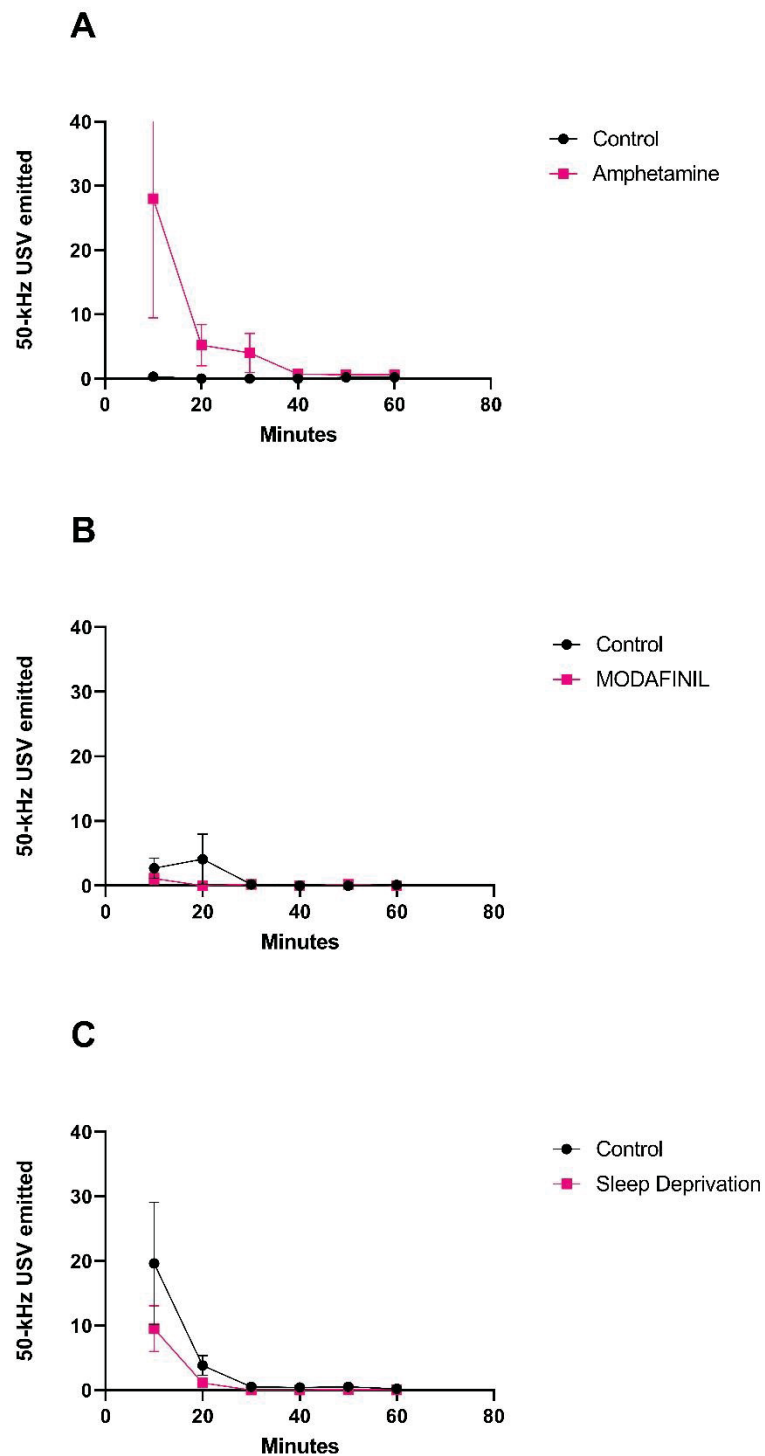


Figura 19: Perfil de vocalizações ultrassônicas de 50 kHz emitidas em intervalos de 10 minutos em diferentes modelos de mania em ratos: (A) DL-Anfetamina 5mg/kg. (B) Modafinila 150mg/kg (C) Privação de sono 24 horas. Os dados são expressos como médias + SEM. (n=10 ratos/grupo). *p<0,05.

5.5. Ciclo estral das ratas

Tabela 1 – Fases do ciclo estral após teste do BPM.

	Controle	AMPH	Controle	MOD	N-Priv	Priv
Proestro	2	2	2	2	2	1
Estro	-	3	6	6	6	5
Metaestro	3	4	1	1	1	1
Diestro	4	-	1	1	0	3
Total	9	9	10	10	9	10

Número de ratas em cada fase (De acordo com Vilela et al., 2007)

AMPH: DL-anfetamina (5 mg/kg, ip)

MOD: modafinila (150 mg/kg, ip)

Priv: Privação de sono (24h)

Ao analisar os dados do ciclo estral descritos acima (tabela 1), observamos que o n é muito baixo, impossibilitando uma análise estatística apropriada. De qualquer forma, o uso de ratas fêmeas no estudo nos permitiu trazer importantes discussões sobre dimorfismo sexual e nos orientar em um próximo projeto. Além disso, Becker et al. (2016), comparando a variabilidade de ratos machos e fêmeas em estudos de neurociência, sugerem que, mesmo sem levar em conta o ciclo estral, a variabilidade das fêmeas não é maior do que a dos machos e, portanto, a categorização nas fases do ciclo estral nem sempre é necessária. Além disto, considerando o aspecto translacional, não é comum considerar a fase do ciclo menstrual das mulheres em estudos clínicos com pacientes com transtornos neuropsiquiátricos.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os comportamentos de locomoção (distância percorrida, velocidade), exploração (*hole pokes*) e emissão das USV de 50kHz em ratos machos e fêmeas expostos ao BPM e submetidos a 3 diferentes modelos de indução de comportamento tipo maníaco. Na tabela 2, observa-se um resumo dos resultados observados.

Tabela 2 -Resumo dos resultados comportamentais pontuados, ordenados por Modelo de Mania e sexo

DL-ANFETAMINA	MACHOS	FÊMEAS
50 KHZ USV	0	0
DISTÂNCIA	⤴	⤴
VELOCIDADE	⤴	⤴
HOLE POKES	⤴	⤴

MODAFINILA	MACHOS	FÊMEAS
50 KHZ USV	0	0
DISTÂNCIA	⤵	0
VELOCIDADE	⤵	0
HOLE POKES	0	0

PRIV. DE SONO	MACHOS	FÊMEAS
50 KHZ USV	⤴	0
DISTÂNCIA	0	0
VELOCIDADE	0	0
HOLE POKES	0	0

Analisando os resultados que obtivemos com cada modelo, alguns foram inesperados quando comparados com estudos prévios. Por exemplo, no presente estudo, a DL-anfetamina não aumentou a emissão das USV de 50kHz. Estudo realizado por Pereira e colaboradores (2014), observou que a D-

anfetamina na dose de 2,5mg/kg, eliciu aumento das USV apetitivas, que foi revertido com o uso de fármacos antimaníacos. Nesta linha, Wendler et al. (2016) também observaram aumento das USV de 50kHz com a administração do psicoestimulante lisdexanfetamina (10mg/kg), um pró-fármaco da anfetamina, indicando que fármacos tipo anfetamínicos são poderosos estimulantes farmacológicos para indução de USV apetitivas de 50kHz.

Uma diferença neste estudo para os realizados previamente é a escolha da ausência de cepilho no aparato do BPM, o que pode ter tornado o ambiente mais aversivo para o rato, interferindo na emissão de USV apetitivas. Essa escolha foi devido à estrutura do BPM, uma vez que houve a intenção de avaliar os *hole pokes* e o uso de cepilho poderia atrapalhar a visualização dos furos para o rato, além da queda do cepilho do aparelho devido à maior movimentação do rato pelas intervenções (psicoestimulantes ou privação de sono) poderia introduzir um viés entre os diferentes grupos experimentais. Neste sentido, Natusch e Schwarting (2010) observaram que os ratos vocalizavam mais intensamente em resposta à dl-anfetamina com o uso de cepilho limpo do que aqueles avaliados em ambiente sem cepilho. Em consonância com esta hipótese, estudo não publicado do nosso laboratório também não observou aumento de USV de 50 kHz em resposta à cocaína em um labirinto sem o cepilho. Portanto, a ausência de cepilho poderia ser um dos fatores relacionados à ausência de indução de USV de 50 kHz observada no presente estudo. Em estudos futuros este fator pode ser podemos avaliado, por exemplo, utilizando-se um BPM com cepilho e sem furos no fundo ou usando um anel elevado ao redor dos buracos no chão para evitar que o mesmo caia ou até mesmo deixando o cepilho cair nos buracos e no chão.

Outro diferencial entre o presente estudo e os estudos prévios citados consiste na utilização (estudos prévios) ou não (presente estudo) de habituação ao aparato experimental. Nos estudos prévios (p.ex. Natusch e Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Wendler et al., 2016) houve exposição dos ratos à arena experimental por 3 dias consecutivos, reduzindo o estresse relacionado à neofobia. Considerando que os estudos prévios com o BPM não houve esta habituação, que pode alterar o comportamento locomotor e exploratório, optamos por, neste primeiro estudo, utilizar a mesma metodologia.

Voltando ao estudo de Natusch e Schwarting (2010), estes autores também analisaram atividade locomotora e exploratória dos ratos, também utilizando a d-anfetamina (2,5mg/kg), observando um aumento destes parâmetros, independente da presença ou não de cepilho no aparato. Estes dados concordam com o presente estudo, uma vez que apesar de não termos observado aumento das USV, como esperado, observamos aumento da distância percorrida, da velocidade e do número de *hole pokes*. Logo, neste ponto, nosso estudo reforça mais uma vez o efeito psicoestimulante em ratos, inclusive no BPM, concordando com estudos anteriores (Geyer et al., 1986).

Neste estudo foi observada a progressão das USV emitidas em intervalos de 10 minutos, com sua evolução durante os 60 minutos de teste (Figuras 18 e 19). Para as USV, tanto em machos quanto em fêmeas, há um pico de vocalizações no início do teste, durando até aproximadamente 40 minutos. Como não temos a mesma progressão registrada para atividade locomotora, não é possível comparar os picos destes efeitos da dl-anfetamina. Entretanto, como foi observado hiperlocomoção na ausência de aumento da emissão de USV apetitivas de 50 kHz, os dados vão na direção da independência destas variáveis, conforme proposto anteriormente (Natusch and Schwarting, 2010; Wendler et al., 2016, 2019; Kanazawa et al., 2021). Portanto, estes parâmetros não são parâmetros intercambiáveis ou redundantes. Além disto, a detecção de aumento da atividade locomotora indica a atividade do fármaco utilizado.

Foi demonstrado que a modafinila aumenta atividade e exploração (através de *rearing*) em camundongos machos C57BL/6J e 129/SJ utilizando o aparato do BPM (Young et al., 2011). Em ratos, não observamos o mesmo padrão comportamental. Não houve aumento da emissão de USV de 50kHz, assim como atividade locomotora e exploratória tanto em machos quanto em fêmeas. Para os dois últimos parâmetros, não apenas não houve aumento, como houve uma diminuição significativa observada nos ratos machos. Isso pode ter ocorrido devido a uma maior sensibilidade destes ratos à modafinila, tendo por consequência indução de estereotipia e diminuição dos outros comportamentos analisados. Uma possível explicação para este resultado indicativo de dimorfismo sexual pode estar relacionada com a diferença de expressão de DAT entre os sexos. Foi observado que ratas Sprague-Dawley têm uma maior

expressão de DAT no núcleo accumbens em relação aos machos (Harrod et al., 2004). Logo, levantamos a hipótese que a inibição de DAT produzida pela modafinila (considerado um fraco inibidor do DAT) na dose de 150mg/kg pode não ser alta o suficiente para causar estereotipia nas fêmeas como supostamente aconteceu com os machos. Por outro lado, Beatty e Holzer (1978) avaliaram o dimorfismo sexual em ratos machos e fêmeas em relação à estereotipia, observando que ratas fêmeas mostram mais comportamento estereotípico que os machos após administração de anfetamina.

Como proposta para um estudo futuro, uma alternativa seria realizar uma curva de dose-resposta com modafinila e anfetamina com o objetivo de comparar com precisão o dimorfismo sexual em relação aos comportamentos estereotipados, atividade locomotora e exploratória e emissão de USV para melhor compreensão deste tema.

Em relação à privação de sono, no presente estudo foi observado um aumento da emissão das USV de 50kHz apenas em ratos machos, indicando um dimorfismo sexual e concordando com estudos anteriores que sugerem um maior efeito na emissão de USV de ratos machos (Souza, 2018). Porém não houve efeito na atividade locomotora, diferente do observado em estudos anteriores (Gessa et al., 1995; Abrial et al., 2014; Wendler et al., 2019). Wendler e colaboradores (2019), utilizando 24 e 72 horas de privação de sono, observaram aumento tanto das USV de 50kHz, quanto de atividade locomotora, que foram revertidos pela administração de lítio. Entretanto, o efeito da privação de 72 horas foi significativamente maior do que o observado pela privação de 24h. Ao escolher o método utilizado neste estudo, havia evidências de que o período de 24 horas seria suficiente para produzir os comportamentos maníacos com menor estresse dos ratos do que o provocado pelo modelo de 72 horas. Além disto, uma privação com duração de 24 horas teria um aspecto mais translacional para a clínica. A ausência dos resultados observados no presente estudo pode estar relacionada com essa escolha da curta duração da privação, que poderia estar em um limiar para indução de alterações comportamentais tipo maníacas (ou seja, alguns ratos responderiam com indução e outros não). Um novo estudo com maior duração da privação (48 ou 72) ou com privação de 24h

repetidas seria interessante para avaliar as diferenças comportamentais, tanto em relação às USV quanto locomoção e exploração.

Uma limitação do presente estudo é o emprego de apenas uma dose de cada fármaco e o tempo de observação (até 1h após a administração dos fármacos). Engelhardt et al. (2017) observou que, em ratos juvenis, a d-anfetamina acarreta uma curva em U invertido em relação à emissão de USV, com o pico ocorrendo com 2,5 mg/kg e doses de 0,5 e 5,0 mg/kg eliciando os menores aumentos. A dose de dl-anfetamina utilizada no presente estudo corresponderia a uma dose de d-anfetamina entre 2,5-5,0 mg/mg, ou seja, dentro da faixa de atividade. Já em relação à modafinila, as doses de 100-300 mg/kg são capazes de indução de hiperlocomoção (Edgar and Seidel, 1997). Apesar destas considerações, claramente, estudos com avaliando uma curva dose-resposta com cada fármaco emprego são necessários.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que, para ratos, a simples adição do registro de vocalizações ultrassônicas de 50kHz ao perfil comportamental do BPM não aumentou o perfil de comportamento maníaco, sendo necessário, portanto, ainda incluir algumas alterações adicionais no procedimento proposto. Além disso, esses resultados destacam diferenças de resposta entre os modelos de mania e um dimorfismo sexual que ainda precisam ser mais amplamente explorados, mas que sugerem que devemos ter cautela quando analisamos resultados de estudos com diferentes modelos e empregando majoritariamente machos, com a finalidade de construir uma hipótese neurobiológica da mania ou desenvolver um medicamento antimaníaco para uso clínico.

REFERÊNCIAS

- ABRIAL, E.; BÉTOURNÉ, A.; ETIÉVANT, A.; LUCAS, G.; SCARNA, H.; LAMBÁSENÃS, L.; HADDJERI, N. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. pyu031, 2015.
- ASHOK, A.; MARQUES, T.; JAUHAR, S.; NOUR, M.; GOODWIN, G.; YOUNG, A.; HOWES, O. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Mol Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 666-679, 2007.
- BASTOS, J. **A inibição da recaptção de dopamina pelo GBR12909 como um possível modelo animal de mania: aspectos comportamentais, farmacológicos e neuroimunológicos**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- BEATTY, W.; HOLZER, G. Sex differences in stereotyped behavior in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 9, n. 6, p. 777-83, 1978.
- BECKER, J. B.; PRENDERGAST, Brian J.; LIANG, Jing W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of sex differences**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2016.
- BERRO, L. **Efeitos da privação de sono sobre diferentes fases da sensibilização comportamental à cocaína**. 2014. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BRUDZYNSKI, S. Biological functions of rat ultrasonic vocalizations, arousal mechanisms, and call initiation. **Brain Sciences**, v. 11, n. 5, p. 605, 2021.
- BURGDORF, J.; WOOD, P.; KROES, R.; MOSKAL, J.; PANKSEPP, J. Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 274-283, 2007.
- BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. The neurobiology of positive emotions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 2, p. 173-187, 2006.
- CIPRIANI, A.; BARBUI, C.; SALANTI, G.; RENDELI, J.; BROWN, R.; STOCKTON, S.; PURGATO, M.; SPINELLI, L.; GOODWIN, G.; GEDDES, J. Comparative efficacy and acceptability of antimanic drugs in acute mania: a multiple-treatments meta-analysis. **Lancet**, v. 378, p. 1306-15, 2011.
- CLAVERO, M.A. **Ausência de associação entre vocalizações ultrassônicas espontâneas de 50 khz e comportamento tipo depressivo e tipo ansioso em ratos: um estudo de correlação e análise fatorial**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.
- COFFEY, K.; MARX, R.; NEUMAIER, J. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 5, p. 859-868, 2019.

DE MIRANDA, A.; ANDREATINI, R.; TEIXEIRA, A. Animal models of mania: essential tools to better understand bipolar disorder. In: **Animal Models for the Study of Human Disease**. Academic Press, 2017. p. 1131-1143.

EDGAR, D.; SEIDEL, W. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 2, p. 757-769, 1997.

EINAT, H. Establishment of a battery of simple models for facets of bipolar disorder: a practical approach to achieve increased validity, better screening and possible insights into endophenotypes of disease. **Behavior genetics**, v. 37, p. 244-255, 2007.

ENGELHARDT, K.-A.; FUCHS, E.; SCHWARTING, R.; WHOR, M. Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 261-273, 2017.

EL-MALLAKH, R.; DECKER, S.; MORRIS, M.; LI, X.; HUFF, M.; EL-MASRI, M.; LEVY, R. Efficacy of olanzapine and haloperidol in an animal model of mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 7, p. 1261-1264, 2006.

GESSA, G. ; PANI, L. ; FADDA, P. FRATTA, W. Sleep deprivation in the rat : an animal model of mania. **European Neuropsychopharmacology**, v. 5, p. 89-93, 1995.

GEYER, M.A.; RUSSO, P.V.; MASTEN, V.L. Multivariate assessment of locomotor behavior: pharmacological and behavioral analyses. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 25, n. 1, p. 277-288, 1986.

GONÇALVES, P.; PESQUERO, B.O.; VALENTIN, D.T.; PEREIRA, V.C.M.; ANDREATINI, R. Effect of repeated sodium valproate and topiramate administration on mania-like behaviors induced by methylphenidate in mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 82, n. 4, p. 511-520, 2022.

GOODWIN, Frederick K.; JAMISON, Kay Redfield. Manic-depressive illness: bipolar disorders and recurrent depression. **Oxford university press**, 2007.

HARROD, S.B.; MACTUTUS, C.F.; BENNETT K.; HASSELROT, U.; Wu, G.; WELCH, M.; BOOZE, R.M. Sex differences and repeated intravenous nicotine: behavioral sensitization and dopamine receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, V. 78, N. 3, p. 581-92, 2004.

KANAZAWA, L.; RADULSKI, D.; PEREIRA, G.; PRICKAERTS, J.; SCHAWTING, R.; ACCO, A.; ANDREATINI, R. Andrographolide blocks 50-kHz ultrasonic vocalizations, hyperlocomotion and oxidative stress in an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 139, p. 91-98, 2021.

KWIATKOWSKI, M.; HELLEMANN, G.; SUGAR, C.; COPE, Z.A.; MINASSIAN, A.; PERRY, W.; GEYER, M.; YOUNG, J.W. Dopamine transporter knockdown mice in the behavioral pattern monitor: a robust, reproducible model for mania-relevant behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 178, p. 42-50, 2019.

LÉDA-RÊGO, G.; BEZERRA-FILHO, S.; MIRANDA-SCIPPA, A. Functioning in euthymic patients with bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis using the Functioning Assessment Short Test. **Bipolar disorders**, v. 22, n. 6, p. 569-581, 2020.

LEVIS, S.C.; BARAM, T.Z.; MAHLER, S.V. Neurodevelopmental origins of substance use disorders: Evidence from animal models of early-life adversity and addiction. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9-10, p. 2170-2195, 2022.

LOGAN, R.; OZBURN, A.; AREY, R.; KETCHESIN, K.; WINQUIST, A.; CRAIN, A.; TOBE, B.; BECKER-KRAIL, D.; JARPE, M.; XUE, X.; ZONG, W.; HUO, Z.; PAREKH, P.; ZHU, X.; FITZGERALD, E.; ZHANG, H.; OLIVER-SMITH, J.; DEPOY, L.; HILDEBRAND, M.; SNYDER, E.; TSENG, G.; MCCLUNG, C. Valproate reverses mania-like behaviors in mice via preferential targeting of HDAC2. **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 8, p. 4066-4084, 2021.

MACHADO, R.; HIPOLIDE, D.; BENEDITO-SILVA, A.; TUFIK, S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. **Brain research**, v. 1004, n. 1-2, p. 45-51, 2004.

MALETIC, V.; RAISON, C. Integrated neurobiology of bipolar disorder. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 98, 2014.

MULVIHILL, K.G.; BRUDZYNSKI, S.M. Effect of microinjections of dopamine into the nucleus accumbens shell on emission of 50 kHz USV: Comparison with effects of d-amphetamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 176, p. 23-32, 2019.

NATUSCH, C.; SCHWARTING, R. K. W. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 251-259, 2010.

PEREIRA, M.; ANDREATINI, R.; SCHARTING, R.; BRENES, J. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania?. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 2567-2577, 2014.

PERRY, W.; MINASSIAN, A.; PAULUS, M. A reverse-translational study of dysfunctional exploration in psychiatric disorders: from mice to men. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 10, p. 1072-1080, 2009.

ROYBAL, K.; THEOBOLD, D.; GRAHAN, A.; DINIERI, J.; RUSSO, S.; KRISHNAN, V.; CHAKRAVARTY, S.; PEEVEY, J.; OEHRLEIN, N.; BIRNBAUN, S.; VITATERNA, M.; ORSULAK, P.; TAKAHASHI, J.; NESTLER, E.; CARLEZON, W.; MCCLUNG, C. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6406-6411, 2007.

SCHWARTING, Rainer. Course Protocols: Behavioral testing in laboratory rodents. Philipps-Universität Marburg, 2014.

SERRA, M.; MARONGIU, J.; SIMOLA, N. Lack of drug-and cue-stimulated emissions of ultrasonic vocalizations in C57BL/6J mice repeatedly treated with amphetamine. **Neuroscience Letters**, v. 749, p. 135733, 2021.

SIMOLA, N.; GRANON, S. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. **Neuropharmacology**, v. 159, p. 107420, 2019.

SOUZA, CP. **Evaluation of sexual difference in a model of mania induced by sleep deprivation in Wistar rats**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

TAYLOR, K.M.; SNYDER, S.H. Differential effects of D-and L-amphetamine on behavior and on catecholamine disposition in dopamine and norepinephrine containing neurons of rat brain. **Brain Research**, v. 28, n. 2, p. 295-309, 1971.

TUFIK, Sergio. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. **Psychopharmacology**, v. 72, p. 257-260, 1981.

VALVASSORI, S.; DAL-PONT, G.; RESENDE, W.; JORNADA, L.; PETERLE, B.; MACHADO, A.; FARIAS, H.; SOUZA, C.; CARVALHO, A.; QUEVEDO, J. Lithium and valproate act on the GSK-3 β signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. **Neuropharmacology**, v. 117, p. 447-459, 2017.

VALVASSORI, S.; DAL-PONT, G.; RESENDE, W.; VARELA, R.; LOPES-BORGES, J.; CARARO, J.; QUEVEDO, J. Validation of the animal model of bipolar disorder induced by Ouabain: face, construct and predictive perspectives. **Translational psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 158, 2019.

VAN ENKHUIZEN, J.; GEYER, M.A.; YOUNG, J.W. Differential effects of dopamine transporter inhibitors in the rodent Iowa gambling task: relevance to mania. **Psychopharmacology**, v. 225, p. 661-674, 2013.

VILELA, MG; JÚNIOR, J. L. S.; SILVA, JG de C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

WENDLER, E.; SOUZA, C.P.; VECCHIA, D.; KANAZAWA, L.; HOCAYEN, P.; WHOR, M.; SCHARTING, R.; ANDREATINI, R. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1900-1908, 2016.

WENDLER, E.; SOUZA, C.P.; DORNELLAS, A.P.S.; SANTOS, L.E.; FERREIRA, S.T.; GALDURÓZ, J. WHOR, M.; SCHARTING, R.; ANDREATINI, R. Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 88, p. 142-150, 2019.

WÖHR, M.; SCHARTING, R.KW. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and tissue research**, v. 354, n. 1, p. 81-97, 2013.

WÖHR, M. Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 17, p. 4201-4219, 2022.

YOUNG, J.; MINASSIAN, A.; PAULUS, M.; GEYER, M.; PERRY, W. A reverse-translational approach to bipolar disorder: rodent and human studies in the

Behavioral Pattern Monitor. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 6, p. 882-896, 2007.

YOUNG, J.; HENRY, B.L.; GEYER, M.A. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1263-1284, 2011.

WÖHR, M.; SCHWARTING, R. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and tissue research**, v. 354, n. 1, p. 81-97, 2013.

WÖHR, Markus. Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 17, p. 4201-4219, 2022.



Nº 1420

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.041833/2021-95

APROVADO/APPROVAL: 21/09/2021 – R.O. 08/2021

TÍTULO: Efeito do inibidor de DAT GBR 12909 nas vocalizações ultrassônicas e comportamentos tipo maníacos de ratos no monitor de padrão comportamental.

TITLE: Effects of DAT inhibitor GBR 12909 on ultrasonic vocalizations and manic-like behaviors of rats in the behavioral pattern monitor.

AUTORES/AUTHORS: Roberto Andreatini, Kellyne de Castro Vieira, Camila Pasquini de Souza.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, Institucional**, em 11/10/2021, às 14:34, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **3915206** e o código CRC **984A2098**.