

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**INFLUÊNCIA DO ESTRO E DA EXPERIÊNCIA SEXUAL NA  
VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA E LATÊNCIA PARA A  
PRIMEIRA A MONTA DE RATOS TRATADOS  
COM IVERMECTINA**

**PAULA DA SILVA RODRIGUES**

**SÃO PAULO**

**2018**

**PAULA DA SILVA RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DO ESTRO E DA EXPERIÊNCIA SEXUAL NA VOCALIZAÇÃO  
ULTRASSÔNICA E LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA MONTA DE RATOS  
TRATADOS COM IVERMECTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi

**SÃO PAULO**

**2018**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 1678564- Código de Financiamento 001)

**PAULA DA SILVA RODRIGUES**

**INFLUÊNCIA DO ESTRO E DA EXPERIÊNCIA SEXUAL NA VOCALIZAÇÃO  
ULTRASSÔNICA E LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA A MONTA DE RATOS  
TRATADOS COM IVERMECTINA**

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi  
Universidade Paulista – UNIP

---

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten  
Universidade Paulista – UNIP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Natalia Moreira  
Universidade de São Paulo - USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi, que além de toda ajuda ao longo do desenvolvimento da minha dissertação, foi também quem me apresentou a área científica, pela qual me apaixonei e tenho me dedicado nos últimos anos. Agradeço por toda confiança e oportunidade de aprendizado que me foi dada.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten que desde o início auxiliou com considerações científicas importantes, sempre demonstrando o quanto é essencial o olhar crítico em cada fase do trabalho, algo que com certeza agregou a profissional que estou me tornando.

Agradeço as alunas de mestrado do programa, a citar Ericka Patricia da Silva e Ana Cláudia Silva Sampaio, por toda a colaboração na realização dos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Moirinho Reis e Silva pela ajuda com as análises estatísticas e todas as considerações científicas compartilhadas ao longo do desenvolvimento do trabalho escrito.

Agradeço ao prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan e a aluna de mestrado do programa, Carolina Cardoso Vieira, pela colaboração com as análises imuno-histoquímicas.

Agradeço a Universidade Paulista pela infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos, bem como pelos ótimos profissionais que me auxiliaram, em especial os técnicos Wilton e Anderson.

Agradeço a CAPES/PROSUP pelo apoio financeiro durante toda a realização do trabalho.

Agradeço aos amigos e familiares, por toda a compreensão e constante incentivo em mais esta etapa do meu desenvolvimento profissional, em especial aos meus pais, que nunca me deixam esquecer a importância do caminho que estou seguindo.

## RESUMO

A ivermectina (IVM) é um dos medicamentos antiparasitários mais utilizados no mundo. Investigações anteriores mostraram que a IVM reduz o comportamento sexual devido ao aumento da incoordenação motora. Assim, para verificar se além da incoordenação motora, a administração de ivermectina também prejudica a motivação sexual, foi avaliada a vocalização ultrassônica (USV) dos ratos e a latência para a primeira monta na tentativa de dissociar a motivação da função motora durante a interação sexual. Devido à influência da experiência sexual do macho e da receptividade da fêmea na avaliação, parâmetros como a resposta a monta em estro fisiológico e farmacológico, e análise das USVs de machos inexperientes e experientes sexualmente foram analisadas. Os ratos foram divididos em três grupos: (I) machos inexperientes e (II) machos experientes sexualmente, ambos expostos a uma fêmea no estro fisiológico e (III) machos inexperientes expostos a fêmeas no estro farmacológico, sendo coletado neste último grupo os encéfalos para avaliação de tirosina hidroxilase estriatal, buscando avaliar se o comprometimento motor causado pela ivermectina é causado por alterações dopaminérgicas. Nossos resultados mostraram que a latência para a primeira monta e as USVs de ratos experientes expostos a fêmea no estro fisiológico foram reduzidas quando comparadas com ratos inexperientes, diferença que pode ter acontecido devido a aquisição da aprendizagem. Quanto à administração de IVM em ratos experientes expostos a fêmeas no estro fisiológico, notou-se um aumento no número de USVs e a latência para a primeira monta, o que apoia a hipótese de que a IVM não prejudica a motivação sexual e o prejuízo causado no comportamento sexual se deve a incoordenação motora. Porém, em ratos inexperientes tratados com IVM expostos a fêmea no estro farmacológico, apenas a frequência da USV aumentou sem alterações na latência para a primeira monta, apesar da marcação de tirosina hidroxilase no estriado estar aumentada neste grupo. O comportamento de fêmeas em estro fisiológico ou farmacológico não foi diferente entre os grupos. Portanto, sugere-se que nos efeitos da IVM relacionados a motivação sexual é mais importante a experiência dos ratos do que a própria ação da IVM.

**Palavras-chaves:** avermectinas, motivação sexual, ultrassons.

## ABSTRACT

Ivermectin (IVM) is one of the most widely used antiparasitic medicines in the world. Previous research has shown that IVM reduced the sexual behavior of rats due to increased motor incoordination. Thus, to verify if in addition to motor incoordination the administration of ivermectin also impairs sexual motivation, the ultrasonic vocalization (USV) of the rats and the latency to the first mount was evaluated in an attempt to dissociate motivation from motor function during sexual interaction. Due to the influence of the male sexual experience and the receptivity of the female in the evaluation, we analyzed parameters such as the response to mount in physiological and pharmacological estrus and the analysis of USV's of inexperienced and sexually experienced males. The rats were divided into three groups: (I) inexperienced males and (II) sexually experienced males, both exposed to a female in physiological estrus and (III) inexperienced males exposed to females in the pharmacological estrus, being collected in the latter group the brains for evaluation of striatal tyrosine hydroxylase, to assess whether motor impairment caused by ivermectin is caused by dopaminergic changes. Our results showed that the latency for first mount and the USV's of experienced rats exposed to females in physiological estrus were reduced when compared to inexperienced rats, this difference may have occurred due to acquisition of learning. The administration of IVM in experienced males exposed to females in physiological estrus increased the number of USV's and latency for first mount, which supports the hypothesis that IVM does not impair sexual motivation and the prejudice caused in sexual behavior is due to motor incoordination alone. However, in inexperienced rats treated with IVM exposed to the female in the pharmacological estrus, only the frequency of the USV's increased without alteration in latency for first mount, although the tyrosine hydroxylase labeling in the striatum was increased in this group. The behavior of females in physiological or pharmacological estrus was not different between the groups. Therefore, it is suggested that regarding the effects of IVM related to sexual motivation, the experience of rats is more important than the action of IVM itself.



**Keywords:** avermectins, sexual motivation, ultrasounds.

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	11
1.1	Sobre a ivermectina .....	15
1.2	Comportamento sexual em ratos .....	17
1.2.1	Comportamento sexual da fêmea.....	18
1.2.2	Comportamento sexual do macho .....	21
1.3	Sobre a vocalização ultrassônica em ratos .....	22
2	Objetivo geral.....	23
2.1	Objetivos específicos .....	23
3	Material e Método .....	24
3.1	Animais .....	24
3.2	Tratamentos .....	25
3.3	Comportamento Sexual Feminino.....	25
3.4	Comportamento sexual do masculino .....	26
3.5	Avaliação da USVs.....	26
3.6	Imuno-histoquímica da tirosina hidroxilase estriatal .....	26
3.7	Delineamento experimental.....	27
3.8	Análise estatística .....	29
4	Resultados.....	29
5	Discussão .....	30
6	Considerações finais.....	31
	Refêrências Bibliográficas .....	32
	Anexos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	Anexo A – Aprovação do CEUA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1 Introdução

A ivermectina (IVM) é um medicamento antiparasitário utilizado atualmente em diferentes áreas da saúde. Na medicina humana é aplicada principalmente em casos de filarioses linfáticas, como a elefantíase, caracterizada pela presença dos parasitas *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* no sistema linfático<sup>1,2</sup>. Na medicina veterinária é utilizada tanto no tratamento de endoparasitas em animais de pequeno porte, quanto de forma terapêutica ou profilática em animais de grande porte contra ectoparasitas<sup>2</sup>.

Os antiparasitários são medicamentos de grande importância, dado a alta incidência deste tipo de infecção. Em cães e gatos as parasitoses já se tornaram o tipo de infecção mais prevalente e, em humanos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliou que nos últimos 10 anos mais de 4,5 bilhões de pessoas em todo o mundo já foram infectadas por algum parasita<sup>3,4</sup>. Apesar da variedade de antiparasitários, o uso da IVM destacou-se principalmente no Brasil, por conta da sua utilização na pecuária de corte, definida como a produção e criação de animais para o consumo<sup>5</sup>.

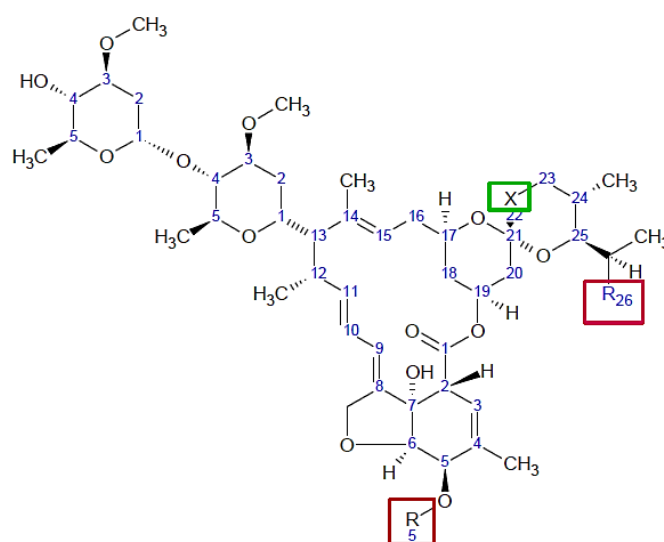
A pecuária de corte é um dos pontos fortes da economia brasileira. Além de ser um dos grandes exportadores, o Brasil chegou a ocupar a segunda posição entre os produtores mundiais de carne bovina em 2008 — ficando atrás apenas dos Estados Unidos<sup>5</sup>. Atualmente, 80% dos criadouros de gado do país adotam o sistema extensivo, no qual as criações são feitas em grandes áreas e o animal se alimenta exclusivamente de pastagem. Devido o país apresentar um clima tropical e subtropical, o aparecimento de microrganismos e parasitas é favorecido, tornando-se essencial o uso de antiparasitários eficazes e seguros a fim de manter a qualidade de vida do animal e da carne vendida posteriormente<sup>6,7</sup>.

Houve um grande avanço nesta questão na década de 1970 com a descoberta das avermectinas, família de substâncias a partir da qual a IVM foi criada<sup>8-10</sup>. As avermectinas foram descobertas durante um experimento que visava avaliar a capacidade antiparasitária de caldos de fermentação de diferentes bactérias, coletadas do solo pelo pesquisador Satoshi Omura. Em parceria com o pesquisador William Campbell, eles identificaram um produto de

fermentação da bactéria *Streptomyces avermitilis*, capaz de facilitar a eliminação do parasita intestinal *Heligomosoides polygyrus* em camundongos infectados. Após serem purificados, os ativos caracterizaram uma nova família das lactonas macrocíclicas, as avermectinas<sup>8</sup>.

As avermectinas são constituídas de quatro compostos que se diferenciam pela sua estrutura, são eles: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Figura 1). A diferença entre os compostos A e B são nas posições C5 com a presença de um grupamento metoxi ou hidróxi e na C25 que contém um grupamento butil ou isopropil, respectivamente. Os tipos um e dois, são diferenciados por uma ligação dupla entre C22 e C23 no primeiro caso e um hidrogênio na C22 e um grupamento hidróxi na C23 no segundo caso<sup>11</sup>.

**Figura 1. Estrutura química da avermectina e seus compostos.**



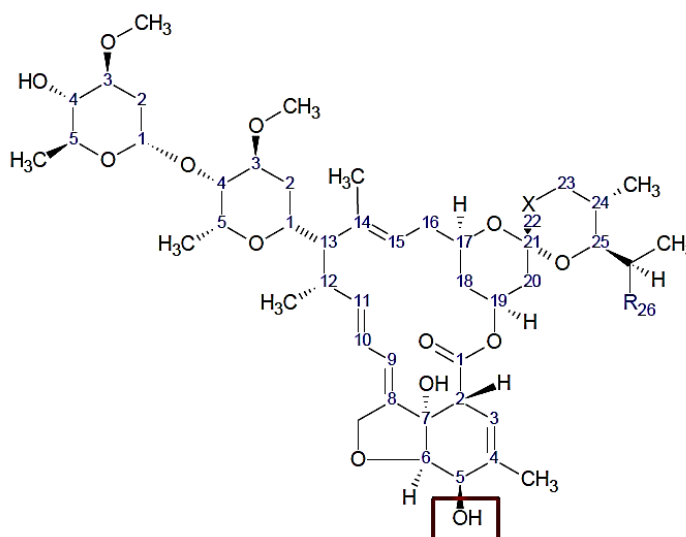
Componentes	Grupamentos	Substituintes
Componente A	R <sub>5</sub>	—CH <sub>3</sub>
Componente B	R <sub>5</sub>	—H
Componente 1	X	CH <sub>2</sub> — $\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{C}}}$ —
Componente 2	X	—CH=CH—
Componente a	R <sub>26</sub>	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub>
Componente b	R <sub>26</sub>	—CH <sub>3</sub>

Fonte: Moreira, 2015<sup>12</sup>

Apesar de todos os compostos possuírem capacidade antiparasitária quando testados em ovelhas com nematódeos gastrointestinais, a comercialização passou a ser feita focada nas variantes B por demonstrarem maior atividade anti-helmíntica no estudo realizado. As diferenças nas posições C22 mostraram eficácias diferentes de acordo com a via de administração, o tipo B1 obteve melhor eficácia quando administrado de forma oral e o B2, por via parental<sup>13</sup>.

Assim, a IVM foi desenvolvida a partir de subgrupos da variável B1 da avermectina e possui em sua composição cerca de 80% de 22,23-di-hidro-avermectina B1a e 20% 22,23-di-hidro-avermectina B1b (Figura 2)<sup>14</sup>.

**Figura 2. Estrutura química da ivermectina.**



Fonte: Moreira, 2015<sup>12</sup>

A IVM não é um parasiticida (classe de medicamentos que causam a morte do parasita), é um medicamento antiparasitário, que são substâncias que facilitam a eliminação dos parasitas. Para tanto, a IVM atua como agonista de canais iônicos de cloro, que em invertebrados tem como ligante o glutamato e seu receptor denominado GluCl. Estes receptores estão localizados em células musculares somáticas e, quando ativados, abrem canais iônicos de cloro aumentando a condução intracelular do íon de cloreto, o que causa a hiperpolarização da membrana neuronal. Essa atividade impede a geração do

potencial de ação, resultando na paralisia dos músculos somáticos e consequente eliminação do parasita<sup>15,16</sup>.

Em vertebrados, diversas evidências indicam que os compostos desta classe interagem com canais de cloro mediados por outros neurotransmissores, como o GABA, o neurotransmissor inibitório mais importante em mamíferos. Em estudo comparativo entre a avermectina B1a e moduladores de receptores gabaérgicos em membranas neuronais, Pong et. al.<sup>17</sup> sugeriram que os sítios para avermectina B1a, benzodiazepínicos, pentobarbital e picrotoxina estão acoplados alostéricamente ao receptor GABAérgico / canal de cloro.

O GABA é importante em diversos comportamentos de mamíferos, dentre eles, o comportamento sexual. Este tipo de comportamento quando avaliado em roedores é dividido em três fases e cada uma delas ativa diferentes vias neurais tanto no macho quanto na fêmea. O GABA participa da fase de inativação que acontece no macho após a ejaculação<sup>18</sup>.

Pensando nisso, Bernardi et. al.<sup>19</sup> analisaram se a ivermectina por ser um medicamento GABAérgico, prejudicaria o comportamento sexual em ratos. Foi então observado que a IVM prejudica o comportamento sexual em ratos machos sexualmente inexperientes, não afetando os experientes, sendo os prejuízos encontrados principalmente nas latências para monta, para primeira intromissão e para monta pós-ejaculação. As latências durante o comportamento sexual são relacionadas a motivação sexual, portanto propôs-se que a IVM teria reduzido a motivação sexual dos ratos machos.

Para investigar este aspecto, Moreira et. al.<sup>20</sup> observaram alterações induzidas pela IVM em um modelo específico para avaliar a motivação sexual de ratos. Estes autores não observaram diferenças significativas na motivação dos animais tratados com IVM em relação ao seu respectivo grupo controle. Por outro lado, a IVM aumentou a incoordenação motora no teste de trave elevada e reduziu os níveis de testosterona dos ratos. Concluiu-se, naquele momento, que a redução nas latências para a monta e intromissão observadas por Bernardi et. al.<sup>19</sup> poderiam ser consequência da incoordenação motora e não da motivação sexual. Porém, ainda ficaram dúvidas quanto a influência da ivermectina na motivação sexual, devido a necessidade da coordenação

motora que se mostrou prejudicada, no teste usado para avaliação da motivação sexual no estudo realizado.

### 1.1 Sobre a ivermectina

Existem três classes de receptores gabaérgicos conhecidos: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>. Os tipos A e C são receptores ionotrópicos e apresentam ação inibitória rápida por possuírem canais de cloreto. Esses canais são abertos e por meio do influxo de íons impede o potencial de ação, gerando inibição sináptica<sup>21,22</sup>. Já os receptores gabaérgicos do tipo B são metabotrópicos, sendo receptores ligados a proteínas G. Esses receptores através de segundos mensageiros modulam canais de cloro (Cl<sup>-</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>), inibindo dessa forma a inibição do sinal de forma mais lenta<sup>23</sup>.

Cada uma das classes de receptores gabaérgicos possuem diferentes subunidades que, por sua vez fazem com que tenham propriedades farmacológicas distintas. Isso pode explicar a variação de efeitos provocados pela administração de IVM<sup>24</sup>.

Por ser um medicamento lipofílico, a IVM é bem absorvida por todas as vias de administração e, devido à sua lipossolubilidade, pode ainda se depositar em vários tecidos, em particular no tecido adiposo. Devido a isto, apesar de ter maior eficácia por via oral é normalmente administrada por via subcutânea permanecendo depositada no local da aplicação devido a sua oleosidade, ficando assim por mais tempo no organismo<sup>25</sup>. Após 4 horas da administração de doses terapêuticas de IVM, que normalmente variam de 0,2 a 1,0 mg/kg<sup>26,27</sup>, atingem o pico de níveis plasmáticos diminuindo lentamente após este período<sup>28</sup>.

A biotransformação é feita por via hepática, e os elevados níveis de metabólitos sugerem que este processo ocorre pelo ciclo entero-hepático. O principal metabólito gerado neste processo é o 24-hidro-ximetil-dihidroivermectina B<sub>1a</sub><sup>29</sup>. O tempo de meia vida do medicamento em adultos é de 22 a 28 horas e a excreção total é feita por volta de 12 dias após a administração, sendo eliminada 98% através das fezes, 1% pela urina e em níveis muito pequenos pelo leite materno<sup>28,30</sup>.

A toxicidade da IVM é considerada moderada, segundo a avaliação da dose letal 50% (DL50) em ratos. A DL50 administrada por via oral é de 50 mg/kg, por via intraperitoneal é de 55 mg/kg e 660 mg/kg por via dérmica<sup>31</sup>.

No entanto, observam-se riscos neurológicos para cães com deleção no gene MDR1, que é responsável por codificar a glicoproteína P<sup>32</sup>. A glicoproteína P é uma proteína transmembrana que está envolvida com a proteção celular através do transporte de substâncias exógenas para fora da célula, para evitar acúmulo e toxicidade que resulta em dano celular. Este tipo de proteína está presente no pâncreas, glândulas adrenais, estômago, intestino, nos testículos e no cérebro, na barreira hematoencefálica<sup>33,34</sup>. A administração de IVM em cães com essa mutação gera um acúmulo e consequente intoxicação no sistema nervoso central, gerando sintomas como ataxia, paralisia, tremores, bradicardia e dependendo dos níveis de intoxicação pode levar o animal ao óbito<sup>12</sup>.

A IVM foi aprovada para uso pelo *Food And Drug Administration* (FDA) em 1996 e passou a ter grande uso na medicina veterinária, principalmente na pecuária, e em seres humanos devido a sua alta margem de segurança dentro da dose terapêutica<sup>11,35</sup>. Por apresentar um amplo uso e ter demonstrado boa tolerância inclusive em crianças<sup>36</sup>, é fundamental estudos cada vez mais aprofundados sobre seus possíveis efeitos colaterais.

Devido a capacidade de o sistema GABAérgico modular o comportamento sexual, muitos trabalhos foram feitos pelo nosso grupo com o objetivo de investigar os efeitos da IVM neste comportamento. Desta forma, foi observado que as doses de 1,0 mg/kg e 2,0 mg/kg da IVM prejudicaram o comportamento sexual em ratos machos sexualmente inexperientes, mas não nos experientes sexualmente<sup>19</sup>. Outro trabalho revelou também que a IVM administrada tanto em fêmeas em estro fisiológico como farmacológico reduziu o comportamento sexual de fêmeas<sup>37</sup>.

A administração de 1,0 mg/kg de IVM no período juvenil prejudicou também o dimorfismo sexual observado em campo aberto e labirinto em cruz elevado. Este prejuízo foi atribuído aos maiores níveis de corticosterona nas fêmeas. Por outro lado, quando estes animais foram submetidos ao estresse de contenção, a IVM apenas prejudicou o dimorfismo sexual no labirinto em



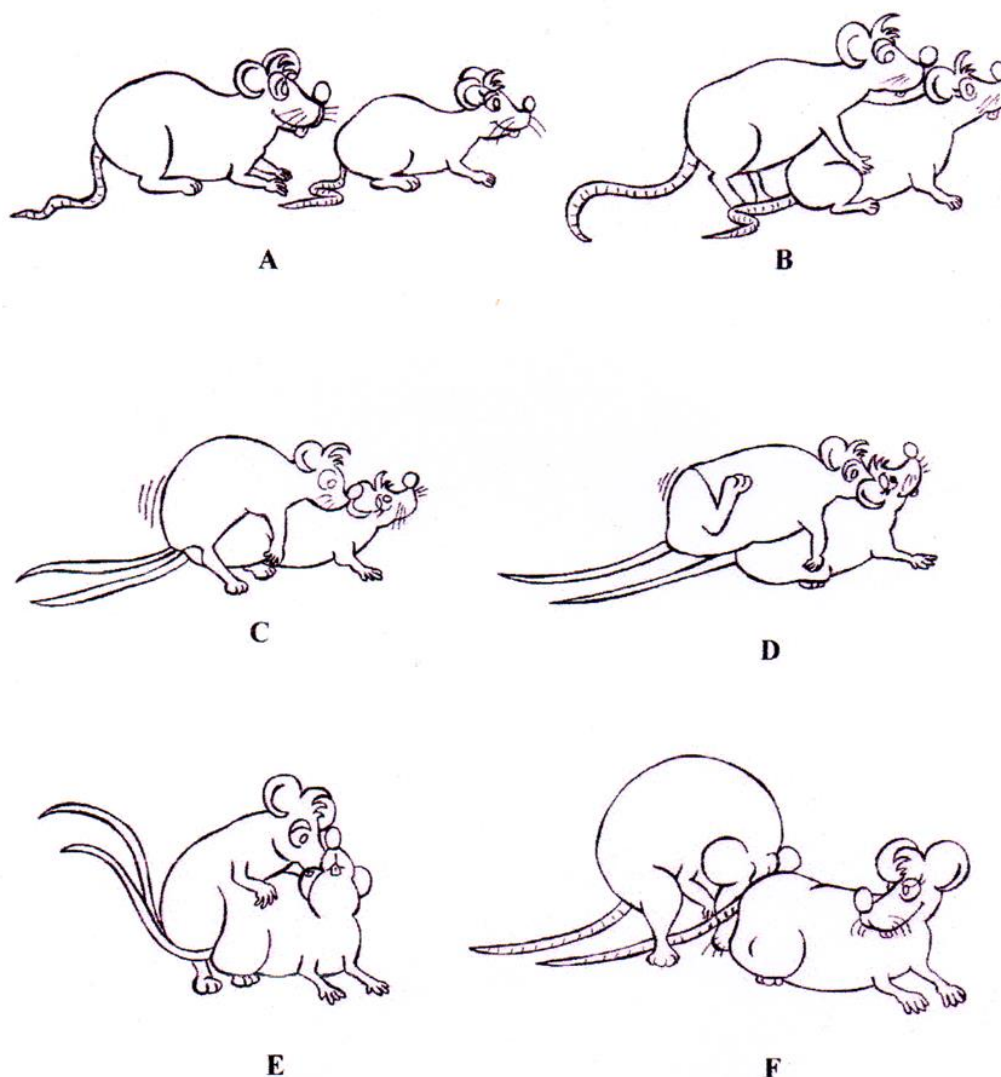
cruz elevado<sup>38</sup>. Esta mesma dose de IVM administrada em ratos adultos prejudicou também a espermatogênese e a espermiogênese<sup>39</sup>.

## **1.2 Comportamento sexual em ratos**

O comportamento sexual em ratos é caracterizado por uma sequência de ações realizadas tanto pelo macho e quanto pela fêmea e divididas em três etapas: a primeira compreende toda ação que precede a cópula, conhecida como fase de motivação sexual ou pré-copulatória, a segunda é o acasalamento e a terceira é a fase ejaculatória<sup>40</sup>.

Na presença de uma rata em período receptivo do ciclo estral, o macho inicia o comportamento sexual com o ato de cheirar a região anogenital da fêmea e obtém como resposta pequenos saltos e corridas repentinas, que induz o rato a fazer a monta (agarrar por trás). A monta estimula a fêmea a facilitar a penetração vaginal pelo pênis através do reflexo de lordose, caracterizado pelo encurvamento do dorso da fêmea que permite que ocorra a intromissão (inserção do pênis na vagina), que é seguida pela autolimpeza da região genital pelo macho (figura 3). Após intromissões repetidas, se inicia a fase ejaculatória, marcada por um salto do macho para trás, que, em seguida vai realizar a autolimpeza e fica inativo por cerca de 6 minutos até conseguir iniciar um novo ciclo copulatório<sup>41</sup>.

**Figura 3. Parâmetros da fase pré-copulatória e copulatória do comportamento sexual de ratos.**



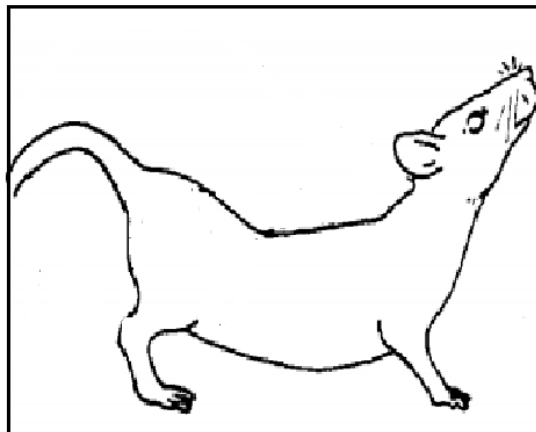
(A) Aproximação (B) Montagem (C) Empurrão da pelve antes da penetração peniana (D) Chute com uma das patas posteriores após a penetração (E) Salto para trás após penetração rápida (F) Autolimpeza da região genital. Fonte: Alves, 2003<sup>42</sup>

### 1.2.1 Comportamento sexual da fêmea

Uma característica importante na receptividade sexual da rata é a sua postura durante a cópula, denominada reflexo de lordose (figura 4). Esta postura caracteriza-se por flexão dorsal da coluna vertebral que ocorre em resposta a montagem do macho permitindo a intromissão peniana<sup>43</sup>. A lordose inicia-se quando a fêmea está sob a ação dos hormônios sexuais, estrogênio e progesterona, sendo eliciada pela estimulação tátil promovida pela montagem do

macho. Na ausência deste reflexo, a intromissão e a ejaculação não são possíveis de ocorrer<sup>44</sup>.

**Figura 4 - Rata em Lordose**

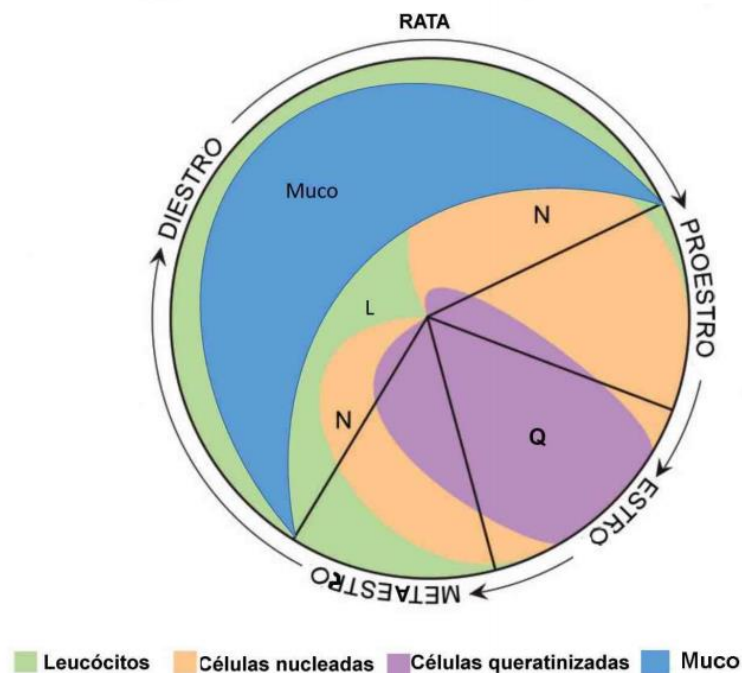


Fonte: (Bernardi, 2018)

Para que a cópula aconteça são então necessários mecanismos endócrinos e neurais tanto no macho quanto na fêmea, que estimulam este comportamento<sup>45</sup>.

Assim como nos seres humanos, é necessária a produção e liberação de óvulos pelo ovário para que aconteça a reprodução. Este processo se inicia com a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRh) pelo hipotálamo, o qual age na hipófise levando a liberação do hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Estes dois hormônios estimulam o desenvolvimento folicular, havendo a secreção cíclica de estrógeno e progesterona antes da ovulação, característica do estro, tornando a rata receptiva ao macho. Este ciclo dura por volta de 4 a 5 dias e passa por fases denominadas proestro, estro, metraestro e diestro que são diferenciadas através de esfregaço vaginal, por conta da diferenciação celular em cada uma delas (Figura 5)<sup>45,46</sup>.

**Figura 5. Ciclo estral e a diferenciação celular em esfregaço vaginal de ratas.**



Da Silva Sasso et. al.<sup>47</sup>

A análise da motivação sexual da fêmea se baseia no número de corridas e saltos durante a estimulação do macho e na análise da lordose. A lordose pode ser medida quanto à sua qualidade, mediante atribuição de scores de 0 a 4, baseados no grau de curvatura da coluna vertebral da fêmea. A quantidade de lordose também pode ser avaliada pelo quociente de lordose, dado pelo número de lordoses dividido pelo número total de montas<sup>41</sup>. A principal área envolvida neste tipo de comportamento em fêmeas é o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN), que contém grande quantidade de receptor  $\alpha$  de estrógeno, que juntamente com a progesterona facilitam a lordose<sup>48</sup>. A área cinzenta periaquedutal (PAG), através de uma complexa cooperação com o VMN também facilita a lordose, como já mostrado em estudos através de estimulação elétrica<sup>49</sup>. Essa cooperação envolve ativação de receptores gabaérgicos da PAG, que inibem a postura oposta à lordose que é controlada por essa região, postura conhecida por ante flexão ou cifose<sup>50</sup>.

### 1.2.2 Comportamento sexual do macho

Durante as fases pré-púbere e púbere em ratos, a produção de testosterona aumenta nos machos, tornando-os, assim, aptos para reprodução. Por meio da produção de GhRh pelo hipotálamo, a liberação de LH e FSH pela hipófise ocorre estimulando as células de Leydig localizadas nos testículos a produzirem estrógeno e testosterona. Estes hormônios são responsáveis por ativar áreas cerebrais com grande quantidade de receptores androgênicos como a Área Pré-Óptica Medial (APOM), que modula o comportamento sexual em machos<sup>18</sup>.

Para que aconteça a motivação sexual de machos, é necessário que ocorra a exposição dos mesmos a ratas em fase estro do ciclo estral. Neste período há a liberação de feromônios pela fêmea gerando quimiossinais que passam do bulbo olfatório do macho para amígdala medial e, em seguida, estimulam a APOM<sup>51,52</sup>. A APOM após receber estímulos hormonais por meio da testosterona e estrógeno e da dopamina oriunda da amígdala medial geram a ativação de reflexos genitais e da motivação sexual<sup>18</sup>.

Após a fase inicial de motivação sexual, a cópula acontece por meio de montas e movimentos pélvicos feitos pelo macho, que necessitam de coordenação motora. O aumento de dopamina no sistema nigroestriatal desinibe as vias pelas quais o córtex induz estes movimentos coordenados. Portanto, a dopamina é essencial na modulação da resposta motora durante a cópula<sup>53</sup>.

O comportamento sexual se encerra após a ejaculação do macho, que é modulada por uma via neural diferente. Após diversas intromissões vaginais, a APOM envia estímulos eferentes para áreas tronco cerebrais, mesencefálicas e hipotalâmicas, fazendo com que estas áreas também enviem estímulos, tanto positivos quanto inibitórios para áreas supra espinhais e para a região geradora de ejaculação localizada na medula espinhal lombossacral. Esta última região controla os mecanismos viscerais e somatomotores da ejaculação que precede o período de inativação do macho. O período de inativação é mediado pela ação inibitória da serotonina em regiões hipotalâmicas e de dopamina no núcleo Accumbens promovida pelo GABA, reduzindo assim a diminuição da atividade locomotora<sup>18,54,55</sup>.

### 1.3 Sobre a vocalização ultrassônica em ratos

A troca de informações entre os animais é baseada em comportamentos e sons específicos que podem influenciar diferentes reações no receptor conforme o sinal que foi emitido. Os sons variam de acordo com a situação que podem ser prazerosas ou aversivas, como momentos de interação social ou na presença de possíveis predadores, respectivamente. Os tipos de sinais são caracterizados de acordo com a duração dos sons e a frequência, que é medida em quilohertz (kHz)<sup>56</sup>.

Ratos jovens e adultos emitem principalmente duas categorias de USV's, as denominadas de baixa frequência (em torno de 22 kHz) e as de alta frequência (em torno de 50 kHz) e ambas as frequências possuem funções distintas<sup>57-60</sup>. A USVs de 22 kHz geralmente ocorrem em situações aversivas, como a exposição a predadores<sup>61</sup>, dor inescapável, agressão e derrota social<sup>62,63</sup> ou estresse por contenção<sup>64</sup>. Por outro lado, USVs de 50 kHz estão associados a experiências prazerosas<sup>65</sup>. Por exemplo, ratos machos emitem USV's de 50 kHz durante o comportamento sexual<sup>66,67</sup> e no comportamento de brincar<sup>68</sup>.

As frequências de 22 kHz emitidas são detectadas no período pós-cópula ou na pré-cópula quando a fêmea o impede de fazer a monta. Esta frequência também é emitida durante situações aversivas, como no caso de estresse. A emissão de 22 e 50 kHz podem ser encontradas durante uma mesma análise, no comportamento sexual de machos inexperientes, fato que não foi observado em ratos com experiência sexual<sup>56,69,70</sup>.

Ratos machos com experiência sexual vocalizam dentro da faixa de 50-kHz antes mesmo que uma fêmea seja introduzida na caixa de observação, enquanto machos sexualmente inexperientes, iniciam as chamadas principalmente após alguns contatos<sup>71</sup>.

Além da frequência de USV's, outros parâmetros observados são intensidade e duração da emissão dos sons. Alguns estudos mostraram que durante o comportamento sexual, podem ser emitidas chamadas baixas e curtas (*low-short*), altas e longas (*high-long*) e altas e curtas (*high-short*), que se mostraram mais altas ao longo da cópula. As chamadas baixas e longas (*low-long*) demonstram relação com a fase de motivação sexual, quando

acontecem as montas sem intromissão. Apesar da variação da intensidade, a única que demonstrou constância ao longo do comportamento sexual foram as chamadas altas e curtas<sup>72</sup>.

Devido a análises anteriores feitas na avaliação dos efeitos da ivermectina na motivação sexual terem sido realizadas por meio de testes que necessitavam da locomoção do animal e coordenação motora, parâmetro que demonstrou-se prejudicado devido ao tratamento com o medicamento, permaneceram dúvidas quanto ao verdadeiro efeito da IVM na motivação sexual<sup>20</sup>. Por este motivo, o presente trabalho visou avaliar a motivação através da análise de vocalizações ultrassônicas após exposição do macho à uma fêmea no estro, desta forma não seria necessária a locomoção do animal para a realização da análise.

Como as respostas do rato macho incluem a estimulação da fêmea, parâmetro pode influenciar na motivação sexual dos mesmos, bem como o fato dos machos terem experiência sexual ou não <sup>8</sup>, parâmetros como a lordose das fêmeas, diferença do tipo de estro no reflexo de lordose e resposta de machos experientes e inexperientes também foram avaliados. Definiu-se experiência sexual quando foi permitido ao macho ou a fêmea o contato apenas até a primeira monta.

## **2 Objetivo geral**

Dissociar a locomoção da motivação na análise do comportamento sexual de ratos tratados com ivermectina, por meio de vocalizações ultrassônicas e analisar a influência da experiência sexual dos ratos e do tipo de estro das fêmeas utilizadas para motiva-los nos parâmetros analisados.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Analisar a frequência de USVs emitidas por ratos após interação sexual com uma fêmeas no estro fisiológico

2. Avaliar a influência da interação prévia com uma fêmea nas USV's emitidas e na latência para primeira monta de ratos machos
3. Avaliar os efeitos da administração de IVM na dose de 1,0 mg/kg na motivação sexual de machos com experiência sexual expostos a uma fêmea no estro fisiológico
4. Avaliar a resposta de fêmeas com e sem experiência sexual durante interação sexual
5. Avaliar os efeitos da administração de IVM na dose de 1,0 mg/kg na motivação sexual de machos sem experiência sexual expostos a uma fêmea no estro farmacológico
6. Avaliar a resposta de fêmeas em estro fisiológico e farmacológico durante interação sexual
7. Analisar a marcação imuno-histoquímica da tirosina hidroxilase estriatal de ratos tratados com 1,0 mg/kg de ivermectina sem experiência sexual a uma fêmea no estro farmacológico.

### **3 Material e Método**

#### **3.1 Animais**

Trinta e quatro ratos e dezesseis ratas *Wistar* foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) e mantidos nas instalações da Universidade Paulista. Estes ratos foram alojados em grupos de quatro em microisoladores sob temperatura controlada (22-26 °C) e umidade (50-65%) em salas artificialmente iluminadas em ciclo invertido de 12h / ciclo claro / escuro (luzes acesas às 19h) com acesso livre a água filtrada e ração irradiada (BioBase, Águas Frias, Brasil). Aparas de madeira esterilizadas e isentas de resíduos, foram usadas para cama de animais. Os experimentos foram realizados pelo menos quinze dias após a chegada dos animais às instalações para habituação com as novas condições do Biotério na sala com o ciclo de luz invertida. Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA-UNIP (autorização nº



339/15) e seguiram as normas do Comitê de Atenção e Uso Animais de Laboratório, *National Research Council*.

### **3.2 Tratamentos**

A ivermectina (1% Ivomec ® injetável, Merial Animal Health Ltda., Paulínia, SP, Brasil) foi suspenso em Tween 80 (1 gota / 1 ml de 1% Ivomec + solução salina a 0,9%) e administrada por via subcutânea (sc) na dose de 1,0 mg / kg. O Tween 80 foi também administrado como solução controle (1 gota / 1 ml de NaCl a 0,9%). Todas as observações comportamentais foram feitas 24 horas após a administração da ivermectina devido à sua meia-vida<sup>74</sup>. A dose de 1,0 mg/kg foi empregada pois mesmo sendo dose terapêutica, em experimentos anteriores, foi capaz de reduzir o comportamento sexual<sup>19</sup>.

### **3.3 Comportamento Sexual Feminino**

Para avaliar a interação sexual macho-fêmea e a influência do estro fisiológico ou induzido farmacologicamente na vocalização e na resposta do macho frente a uma fêmea foram feitos dois procedimentos com as fêmeas.

No primeiro deles, o ciclo estral das ratas foi observado diariamente e as fêmeas no estro foram selecionadas para a exposição ao rato macho. Para tanto, o estro foi detectado pela presença de células cornificadas anucleadas em esfregaços vaginais<sup>75</sup>.

No segundo procedimento, as ratas foram ovariectomizadas e o estro induzido 21 dias após a cirurgia pela administração de 17- $\beta$  estradiol (50 $\mu$ g/kg,s.c., 48 horas antes dos experimentos) e progesterona (2 mg/kg,s.c., 6 horas antes dos experimentos). Estas ratas foram pareadas com os ratos machos, não pertencentes aos experimentos, permitindo-se que as fêmeas apresentassem lordose. Vinte um dia após este procedimento, as ratas foram novamente induzidas ao estro por estrógeno e progesterona e por fim utilizadas para motivar os ratos pertencentes aos experimentos.

No comportamento das fêmeas em ambos procedimentos atribuiu-se os seguintes escores: 1) fêmeas explorando a caixa ou com pouco atividade, porém sem resposta ao estímulo do macho; 2) fêmea responde ao estímulo do

macho e vocaliza porém não apresenta lordose; 3) presença de lordose com pequeno encurvamento do dorso; 4) presença de lordose com encurvamento máximo do dorso.

### **3.4 Comportamento sexual do masculino**

Dentre os parâmetros do comportamento sexual do rato macho foi observada a latência em segundos para a primeira monta na fêmea. Este comportamento consiste no ato do rato colocar suas patas apoiadas na parte anterior do corpo da fêmea apoiando-se nas patas traseiras como descrito na figura 3. Este parâmetro foi selecionado, pois é considerado a primeira expressão da motivação sexual do rato macho<sup>43</sup>.

### **3.5 Avaliação da USVs**

A sala de teste de vocalização estava acusticamente isolada. Os USV's foram detectados usando o software Ultravox (XT, versão 3.1, Noldus Information Technology, Leesburg, EUA) e um microfone ultrassônico (Noldus Information Technology, Leesburg, EUA). Todos os ultrassons até 125 kHz foram detectados e avaliados. Vários parâmetros foram gravados automaticamente durante a sessão de 5 minutos, incluindo o número de vocalizações, duração média de vocalização (ms), duração máxima de vocalização (ms), tempo total de vocalizações (ms) e frequência dominante de vocalizações.

### **3.6 Imuno-histoquímica da tirosina hidroxilase estriatal**

A marcação imuno-histoquímica para a tirosina hidroxilase foi realizada no estriado dos machos, devido a produção dopaminérgica desta região estar relacionada à coordenação motora que se mostrou prejudicada em experimentos anteriores. A marcação foi feita utilizando o método conjugado a uma cadeia de polímeros (chain polymer-conjugated staining method) (DAKO EnVision System). Foi utilizada imunoglobulina anti-tirosina hidroxilase

monoclonal de camundongo (1:1000, IHCR10056, Chemicon IHC Select Research) como anticorpo primário, seguida pelo kit En Vision (EnVision+ kit, HRP/Rabbit/DAB+, K4011, Dako, Glostrup, Dinamarca). Seis fotomicrografias de cada lâmina analisada foram feitas usando-se a objetiva de 40x. A área marcada em marrom foi calculada automaticamente, utilizando o *index per area* do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA) calibrado com filtros de cores digitais de forma que a coloração de fundo foi excluída da medição. O *index per area* representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação, e 1, a marcação total da área.

### **3.7 Delineamento experimental**

Os experimentos foram divididos em três partes: padronização, parte 1 e parte 2.

Padronização: Neste primeiro experimento foram utilizados 14 machos e 9 fêmeas sem experiência sexual que estavam há no mínimo 21 dias em ciclo de luz invertido, em circuito fechado para que não sentissem o cheiro uns dos outros. Nesta etapa foram utilizadas fêmeas no estro fisiológico e para selecioná-las, nos dias dos experimentos no período da manhã eram analisados esfregaços vaginais feitos nas fêmeas e de acordo com o tipo celular presentes nas lâminas, eram selecionadas as ratas no estro.

Entre as 14 horas e 15 horas machos e fêmeas foram transportados dentro de caixas separadas que os protegia da luz, para a sala onde foram realizadas as gravações das vocalizações. Inicialmente, o rato foi colocado em uma arena de vidro (50x25x40 cm), por 5 minutos para habituação e após este tempo a fêmea era então colocada para habituar. Desta forma, ela sentiria o cheiro do macho na arena, demonstrando que ele não é um intruso quando fosse colocado em seguida.

Após este procedimento, o rato foi colocado junto com a fêmea na arena e a latência para a primeira monta em segundos e a resposta da fêmea à monta em scores forma medidas. Imediatamente após a monta, a fêmea foi rapidamente removida da sala e só então foi iniciada a gravação das

vocalizações por 5 minutos. Após a gravação, ambos os ratos eram devolvidos às suas caixas moradia.

Parte 1: Uma semana após a padronização, os mesmos ratos e ratas foram empregados para avaliação novamente da interação sexual. Nesta fase, após ambos já terem passado por interação sexual prévia na avaliação anterior, os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos iguais ( $n = 7$  por grupo): um recebeu a solução controle e o outro 1,0 mg / kg de IVM, via subcutânea. Vinte e quatro horas após estes tratamentos, ambos os grupos foram novamente avaliados quanto à latência para a primeira monta, respostas das fêmeas novamente em estro fisiológico e as USV's.

Parte 2: Nesta segunda etapa, novos ratos e ratas foram utilizados (20 machos e 7 fêmeas). As fêmeas utilizadas foram induzidas ao estro farmacologicamente, para isso foram ovariectomizadas e, 21 dias após este procedimento, foram induzidas ao estro por estrógeno e progesterona. Estas ratas foram pareadas com machos que não pertenciam ao experimento, permitindo-se a ocorrência de uma lordose. Desta forma, a experiência das fêmeas, não influenciaria na latência para monta dos ratos testes.

Vinte e um dia após este procedimento, as ratas foram novamente induzidas ao estro por estrógeno e progesterona e novamente pareadas, desta vez com os ratos do experimento tratados ou não com IVM na mesma dose, porém sem experiência sexual. Antes das observações, as fêmeas e machos foram habituados às caixas e a latência para primeira monta, resposta das fêmeas à monta e as USVs foram avaliadas e gravadas como descrito no experimento anterior.

Em ambos os experimentos, a arena de vidro foi limpa com uma solução de álcool / água a 5% antes de cada pareamento, para evitar possíveis efeitos de polarização causados por pistas de odor deixadas pelos ratos anteriores. Imediatamente após o segundo experimento, os ratos foram submetidos à eutanásia por decaptação e os encéfalos foram coletados.

### 3.8 Análise estatística

O teste t de Student foi utilizado para analisar dados de vocalizações ultrassônicas, comparar as latências para a primeira monta e marcação imunohistoquímica da tirosina hidroxilase. O teste de Mann-Whitney foi aplicado na comparação de scores de lordose das fêmeas. O teste correlação de Spearman foi usado para analisar a correlação entre as latências para a primeira monta e os parâmetros USV's. Em todos os experimentos,  $p < 0,05$  foi o critério para significância estatística. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

## 4 Resultados

Nossos resultados mostraram que a latência para a primeira monta e as USVs de ratos experientes expostos a fêmea no estro fisiológico foram reduzidas quando comparadas com ratos inexperientes. Quanto à administração de IVM em ratos experientes expostos a fêmeas no estro fisiológico, notou-se um aumento no número de USVs e a latência para a primeira monta. Porém, em ratos inexperientes tratados com IVM expostos a fêmea no estro farmacológico, apenas a frequência da USV aumentou sem alterações na latência para a primeira monta, apesar da marcação de tirosina hidroxilase no estriado estar aumentada neste grupo. O comportamento de fêmeas em estro fisiológico ou farmacológico não foi diferente entre os grupos.

*Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: marthabernardi@gmail.com.*

## **5 Discussão**

*Este volume de Dissertação de Mestrado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: marthabernardi@gmail.com.*

## **6 Considerações finais**

Este estudo mostrou que ratos tratados com ivermectina após interação sexual com ratas em estro fisiológico, ambos com experiência sexual até a primeira monta, apresenta dados alterados quanto à vocalização ultrassônica e latência para a primeira monta. Porém, quando os ratos são avaliados nas mesmas condições, mas sem experiência sexual e expostos a fêmeas em estro farmacológico com experiência até a lordose, as alterações anteriormente encontradas, não acontecem. Portanto, mostrou-se neste caso que as alterações tem mais relação com a experiência sexual dos ratos do que com um efeito da ivermectina propriamente dita. Isto nos mostra a influencia da experiência ou não dos ratos em avaliações de comportamento sexual não só em pesquisas relacionadas a ivermectina, mas na avaliação de possíveis prejuízos no comportamento sexual causados por qualquer outro medicamento.

Demonstramos também que ratos que interagiram com fêmeas no estro somente até a primeira monta, apresentaram comportamento semelhante a ratos com experiência sexual completa, mostrando que neste caso que para que ratos tenham comportamento de ratos experientes sexualmente, não é necessário que executem todas as etapas da cópula.

## Refêrencias Bibliográficas

1. Owusu IO, Vroom FB, Mensah EO, Gyapong M. Elimination of lymphatic filariasis : current perspectives on mass drug administration. 2018;25–33.
2. Crump A. Ivermectin: Enigmatic multifaceted “wonder” drug continues to surprise and exceed expectations. *J Antibiot (Tokyo)*. Nature Publishing Group; 2017;70(5):495–505.
3. Funada MR, Pena HFJ, Soares RM, Amaku M, Gennari SM. Frequency of gastrointestinal parasites in dogs and cats referred to a veterinary school hospital in the city of Sao Paulo. *Arq Bras Med Vet E Zootec*. 2007;59(5):1338–40.
4. Blaszkowska J, Goralska K. Clinical cases of parasitoses and fungal infections important from medical point of view. *Ann Parasitol*. 2016;62(4):255–65.
5. Ferraz JBS, Felício PE de. Production systems - An example from Brazil. *Meat Sci*. Elsevier Ltd; 2010;84(2):238–43.
6. Cesar IM, Queiroz HP, S.Thiago LRL, Cassales FLG, Costa FP. Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate. 2005. 40 p.
7. Chen W. Honoring antiparasitics : The 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomed J*. Elsevier Ltd; 2016;39(2):93–7.
8. Campbell WC. Ivermectin: A Reflection on Simplicity (Nobel Lecture). *Angew Chemie - Int Ed*. 2016;55(35):10184–9.
9. Albers-Schonberg G, Arison BH, Chabala JC, Douglas AW, Eskola P, Fisher MH, et al. Avermectins. Structure Determination. *J Am Chem Soc*. 1981;103(14):4216–21.
10. Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, Cifelli S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Efficacy of the B1(a) component. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;15(3):372–8.



11. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? Trends Parasitol. Elsevier Ltd; 2017;33(6):463–72.
12. Moreira N. Moreira, Natalia. Influência da exposição à ivermectina na esfera sexual de ratos e ratas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. [acesso 2015-09-24] Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-11112014-164346/>. 2014;
13. Campbell WC et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. Science (80- ). 1983;221(4613):823–8.
14. Campbell WC. An Introduction to the Avermectins. N Z Vet J. 1981;29(10):174–8.
15. Verdú JR, Cortez V, Ortiz AJ, González-Rodríguez E, Martínez-Pinna J, Lumaret JP, et al. Low doses of ivermectin cause sensory and locomotor disorders in dung beetles. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2015;5:1–10.
16. Zemkova H, Tvrdonova V, Bhattacharya A, Jindrichova M. Allosteric modulation of ligand gated ion channels by ivermectin. Physiol Res. 2014;63(SUPPL.).
17. Pong S, Wang CC. Avermectin B1, Modulation of  $\gamma$ -Aminobutyric. 1982;
18. Hull EM, Dominguez JM. Sexual behavior in male rodents. Horm Behav. 2007;
19. Bernardi MM, Kirsten TB, Spinosa HS, Manzano H. Ivermectin impairs sexual behavior in sexually naïve, but not sexually experienced male rats. Res Vet Sci. Elsevier Ltd; 2011;91(1):77–81.
20. Moreira N, Sandini TM, Reis-Silva TM, Navas-Suárez P, Auada AVV, Lebrun I, et al. Ivermectin reduces motor coordination, serum testosterone, and central neurotransmitter levels but does not affect sexual motivation in male rats. Reprod Toxicol. 2017;74.

21. Chua HC, Chebib M. GABAARceptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. 1st ed. Vol. 79, Advances in Pharmacology. Elsevier Inc.; 2017. 1-34 p.
22. Chebib M. GABAC receptor ion channels. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004;31(11):800–4.
23. Frangaj A, Fan QR. Structural biology of GABABreceptor. Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2018;136:68–79.
24. Adelsberger, Helmuth; Lepier, Alexandra; Dudel J. ( + ) - And ( Å ) - borneol : efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant a 1 b 2 g 2L GABA A receptors. J Pharmacol. 2000;394:163–70.
25. ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Agência Nac Vigilância Sanitária. 2009;1–76.
26. Dadarkar SS, Deore MD, Gatne MM. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. Regul Toxicol Pharmacol. 2007;47(3):257–60.
27. Bridi AA, Carvalho LA, Cramer LG, Barrick RA. Efficacy of a long-acting formulation of ivermectin against *Psoroptes ovis* (Hering, 1838) on cattle. Vet Parasitol. 2001;97(4):277–83.
28. Chhaiya S, Mehta D, Kataria B. Ivermectin: pharmacology and therapeutic applications. Int J Basic Clin Pharmacol. 2012;1(3):132.
29. Spinosa H de S, Górnica SL, Bernardi MM. Farmacologia. Sexta. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2017. 575 p.
30. Indústria V, Ltda F. Ivermectina. 2017;1–11.
31. TEMPLE, W. A.; SMITH MA. Ivermectin. International Programme on Chemical Safety. 1994.
32. Monobe M, Bulla C, da Silva R, Lunsford K, Araujo Jr JP. Frequency of

- the MDR1 mutant allele associated with multidrug sensitivity in dogs from Brazil. *Vet Med Res Reports*. 2015;(JANUARY):111.
33. Lee G, Joung J, Cho J, Son C, Lee N. Overcoming P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in Colorectal Cancer : Potential Reversal Agents among Herbal Medicines. *Hindawi*; 2018;2018.
  34. Hu K, Li H, Ou R, Li C, Yang X. Tissue accumulation and toxicity of isothiazolinone in *Ctenopharyngodon idellus* ( grass carp ): Association with P-glycoprotein expression. *Environ Toxicol Pharmacol*. Elsevier B.V.; 2014;37(2):529–35.
  35. Panahi Y, Poursaleh Z, Goldust M. The efficacy of topical and oral ivermectin in the treatment of human scabies. *Ann Parasitol*. 2015;61(1):11–6.
  36. Chosidow A, Gendrel D. Tolérance de l'ivermectine orale chez l'enfant. *Arch Pediatr*. 2016;23(2):204–9.
  37. Moreira N, Bernardi MM, Spinosa HS. Ivermectin reduces sexual behavior in female rats. *Neurotoxicol Teratol*. Elsevier Inc.; 2014;43:33–8.
  38. Ferreira FR. A ivermectina administrada na idade juvenil prejudica o comportamento sexualmente dimórfico de ratos expostos ou não ao estresse. 2017.
  39. Cordeiro F, Gonçalves V, Moreira N, Slobodtsov JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, et al. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. *Res Vet Sci*. Elsevier; 2018;117(December 2017):178–86.
  40. Ávila MAP, Marthos GCP, Oliveira LGM, Figueiredo EC, Giusti-Paiva A, Vilela FC. Effect of prenatal ethanol exposure on sexual motivation in adult rats. *Alcohol*. Elsevier Inc; 2016;54:11–6.
  41. Heijkoop R, Huijgens PT, Snoeren EMS. Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. *Behav Brain Res*. Elsevier B.V.; 2018;352:70–80.

42. Alves R, Benevides P de S e. Efeitos Da Moxidectina No Comportamento Sexual. Universidade de São Paulo; 2003.
43. Pfaff DW, Sakuma Y, Kow L-M, Lee AWL, Easton A. Hormonal, Neural, and Genomic Mechanisms for Female Reproductive. Behaviors, Motivation, and Arousal Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edit. Jimmy D. Neill, editor. 2006. 1825-1920 p.
44. M. Jennifer Rodriguez, Tathiana Aparecida, Fernandes Alvarenga, Edith Monroy-López, Armando Ferreira-Nuño, Adriana Morales-Otal JV-M. Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research. First Edit. Andersen ML, Tufik S, editors. Springer, Cham; 2016. 237-251 p.
45. Young WC. The vaginal smear picture, sexual receptivity and the time of ovulation in the guinea pig. *Anat Rec.* 1937;67(3):305–25.
46. MARCONDES FK. Influencia do Ciclo Estral sobre as Respostas Hormonis de Ratas Sumetidas a Estresse. 1998.
47. Gisela Rodrigues da Silva Sasso Simões, Girão RS, Marques JHRC, Florencio-Silva, Rinaldo SR. O ciclo da rata.
48. Sakuma Y. Estradiol-sensitive projection neurons in the female rat preoptic area. *Front Neurosci.* 2015;9(FEB):1–8.
49. Ogawa S, Kow L-M, McCarthy MM, Schwartz-Giblin S. Midbrain PAG Control of Female Reproductive Behavior: In Vitro Electrophysiological Characterization of Actions of Lordosis-Relevant Substances. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization.* First. Springer US; 1991. p. 211–35.
50. Veening JG, Coolen LM, Gerrits PO. Neural mechanisms of female sexual behavior in the rat; Comparison with male ejaculatory control. *Pharmacol Biochem Behav.* Elsevier B.V.; 2014;121(2013):16–30.
51. Sano K, Tsuda MC, Musatov S, Sakamoto T, Ogawa S. Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor  $\alpha$  in the medial

- amygdala, medial pre-optic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on sexual and aggressive behavior of male mice. *Eur J Neurosci.* 2013;37(8):1308–19.
52. Petrulis A. Chemosignals and hormones in the neural control of mammalian sexual behavior. *Front Neuroendocrinol.* Elsevier Inc.; 2013;34(4):255–67.
  53. Hull EM, Muschamp JW, Sato S. Dopamine and serotonin: Influences on male sexual behavior. *Physiol Behav.* 2004;83(2):291–307.
  54. Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: Emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;
  55. Agmo A, Paredes R, Fernández H. Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1987;28(1):47–52.
  56. Portfors C V., Perkel DJ. The role of ultrasonic vocalizations in mouse communication. *Curr Opin Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2014;28:115–20.
  57. Portfors C V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2007;46(1):28–34.
  58. Pertsov SS, Koplík EV, Karkishchenko NN SK. Ultrasonic Vocalization of Rats in Various Motivational and Emotional States. *Bull Exp Biol Med.* 2012;153(6):805–8.
  59. Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull.* 2002;128(6):961–77.
  60. Brudzynski SM. Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2013;23(3):310–7.
  61. BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC, AGULLANA R, WEISS SM. 22 Khz Alarm Cries To Presentation of a Predator, By Laboratory Rats Living in Visible Burrow Systems. *Physiol Behav.* 1991;50(5):967–72.

62. Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res.* 2006;166(2):271–80.
63. Kim EJ, Kim ES, Covey E, Kim JJ. Social transmission of fear in rats: The role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization. *PLoS One.* 2010;5(12).
64. Kirsten TB, Galvão MC, Reis-Silva TM, Queiroz-Hazarbassanov N, Bernardi MM. Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. *PLoS One.* 2015;10(3):1–12.
65. Burgdorf J, Panksepp J, Brudzynski SM, Kroes R MJ. Breeding for 50-kHz Positive Affective Vocalization in Rats. *Behav Genet.* 2005;35(1):67–72.
66. Barfield, Ronald J; Auerbach, Pamela; Geyer, Lynette A; McIntosh TK. Ultrasonic Vocalizations in Rat Sexual Behavior. *Am Zool.* 1979;19(2):469–80.
67. McIntosh TK, Barfield RJ. The temporal patterning of 40–60 kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (*Rattus norvegicus*). *Behav Neural Biol.* 1980;29(3):349–58.
68. Burgdorf J, Panksepp J, Moskal JR. Frequency-modulated 50kHz ultrasonic vocalizations: A tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci Biobehav Rev.* Elsevier Ltd; 2011;35(9):1831–6.
69. Hernandez C, Sabin M, Riede T. Rats concatenate 22 kHz and 50 kHz calls into a single utterance. *J Exp Biol.* 2017;220(5):814–21.
70. Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *J Neurosci Methods.* Elsevier B.V.; 2014;234:73–81.
71. Bialy M, Strefnel M, Nikolaev-Diak A, Socha A, Nikolaev E, Boguszewski PM. Sexual performance and precontact 50-kHz ultrasonic vocalizations in WAG/Rij rats: Effects of opioid receptor treatment. *Epilepsy Behav.*

- Elsevier Inc.; 2014;39:66–72.
72. White NR, Moises AU, Barfield RJ. Changes in Mating Vocalizations Over the Ejaculatory Series in Rats ( *Rattus norvegicus* ). 1990;104(3):255–62.
  73. Shulman LM, Spritzer MD. Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiol Behav.* Elsevier B.V.; 2014;133:8–13.
  74. Chiu SHL, Green ML, Baylis FP, Eline D, Rosegay A, Meriwether H, et al. Absorption, Tissue Distribution, and Excretion of Tritium-Labeled Ivermectin in Cattle, Sheep, and Rat. *J Agric Food Chem.* 1990;38(11):2072–8.
  75. MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol.* 2002;62(4a):609–14.
  76. Portfors C. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. ... *Am Assoc Lab ....* 2007;
  77. Pfau JG, Wilkins MF. A novel environment disrupts copulation in sexually naive but not experienced male rats: Reversal with naloxone. *Physiol Behav.* 1995;57(6):1045–9.
  78. Bialy M, Rydz M, Kaczmarek L. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav Neurosci.* 2000;114(5):983–90.
  79. Habr SF, Dias RG, Teodorov E, Bernardi MM. Sexual experience did not affect the long-term sexual behavior inhibition of male rats treated with fluoxetine. *Psychol Neurosci.* 2009;2(1):67–73.
  80. Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 2005;84(3):228–40.
  81. Piergies AMH, Hicks ME, Schwartz JP, Meerts SH. Sexually experienced, but not naïve, female rats show a conditioned object preference (COP) for

- mating after a single training trial. *Physiol Behav.* 2019 Jan;198:42–7.
82. Tenk CM, Wilson H, Zhang Q, Pitchers KK, Coolen LM. Sexual reward in male rats: Effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Horm Behav.* Elsevier Inc.; 2009;55(1):93–7.
  83. White NR, Barfield RJ. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 1990;104(2):140–6.
  84. White NR, Barfield RJ. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 1990;
  85. López HH, Olster DH, Ettenberg A. Sexual motivation in the male rat: The role of primary incentives and copulatory experience. *Horm Behav.* 1999;
  86. Beach FA. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav.* 1976;7(1):105–38.
  87. Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav.* 2008;93(4–5):766–76.
  88. Agmo a. Male rat sexual behavior. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1997;1(2):203–9.
  89. Madlafousek J, Hlinak Z. Sexual Behaviour of the Female Laboratory Rat: Inventory, Patterning, and Measurement. *Behaviour.* 1977 Jan;63(3):129–73.
  90. Chiavegatto S, Oliveira CA, Bernardi MM. Prenatal Exposure of Rats to Diphenhydramine: Effects on Physical Development, Open Field, and Gonadal Hormone Levels in Adults. *Neurotoxicol Teratol.* 1997 Nov;19(6):511–6.
  91. Tonkiss J, Smart JL, Griffiths EC. Mating behaviour of male rats following pre- and early postnatal undernutrition: A comparison of two outbred



- stocks. *Physiol Behav.* 1984;32(3):397–401.
92. Rodrigues-Alves PSB, Lebrun I, Flório JC, Bernardi MM, Spinosa H de S. Moxidectin interference on sexual behavior, penile erection and hypothalamic GABA levels of male rats. *Res Vet Sci.* 2008;84(1):100–6.
  93. Felício LF, Couto-Moraes R, de Oliveira CA, Bernardi MM. Post-partum testosterone administration partially reverses the effects of perinatal cadmium exposure on sexual behavior in rats. *Psychol Neurosci.* 2012;5(2):221–9.
  94. Gerardin DCC, Pereira OCM, Kempinas GWG, Florio JC, Moreira EG, Bernardi MM. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav.* 2005;84(1):97–104.
  95. Paredes RG, Karam P, Highland L, Agmo A. GABAergic Drugs and Socio-Sexual Behavior. 1997;58(2):291–8.
  96. Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 2011 Jul;34(1):441–66.

## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada “Influência do estro e da experiência sexual na vocalização ultrassônica e latência para a primeira monta de ratos tratados com ivermectina”, registrada com o nº339/15, sob-responsabilidade de “MARIA MARTHA BERNARDI e PAULA RODRIGUES”, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 20/05/2015.

Finalidade	Ensino ( )	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		05/2017 a 12/2018
Espécie / linhagem/ raça		RATO HETEROGÊNICO
Nº de animais		50
Peso / idade		
Sexo		MACHO/FEMEA
Origem		CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICB)



Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP