

**Tesina para optar por el grado de  
Licenciada en Ciencias Biológicas**

**CAMBIOS EN LA EMISION DE VOCALIZACIONES ULTRASONICAS EN RATAS  
INDUCIDOS POR LA HORMONA CONCENTRADORA DE MELANINA EN EL NUCLEO  
DORSAL DEL RAPE.**

Estudiante: Sara Fabius

Departamento de Neurofarmacología Experimental  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Orientadora: Dra. Jessika Urbanavicius

**Diciembre, 2019**

## Resumen

La emisión de VUs de 50 kHz por ratas adultas ha sido descrita como una respuesta a estímulos positivos o reforzadores y su cuantificación es utilizada para evaluar el estado afectivo/hedónico de los individuos. Éstas se pueden clasificar como *Flat*, o de frecuencia constante, y se asocian a eventos no reforzadores de interacción social; o de frecuencia modulada (FM) vinculadas a estímulos altamente recompensantes como el juego o el encuentro sexual. Más recientemente, algunos trabajos proponen que una disminución en la emisión de este tipo de VUs podría ser un indicador de estados afectivos negativos.

Interesados en el estudio del papel del neuropéptido hipotalámico Hormona Concentradora de Melanina (MCH) en la depresión, demostramos que la microinyección de MCH en el núcleo serotoninérgico dorsal del rafe (NDR; vinculado a la neurobiología de la depresión y su terapéutica) induce un efecto de tipo-depresivo en el test del nado forzado (TNF) en ratas, sensible al tratamiento con antidepresivos (fluoxetina y nortriptilina). Este modelo identifica acciones anti- o pro-depresivas aunque no refleja de manera directa el estado afectivo/emocional del animal. Así, la evaluación de la emisión de VUs parece adecuada para estudiar la respuesta emocional de los animales y complementar la caracterización de la respuesta conductual tipo-depresiva descrita para MCH.

En este trabajo estudiamos si el efecto pro-depresivo inducido por MCH intra-NDR se acompañó de cambios en la emisión de VUs de 50 kHz.

Utilizamos ratas macho, cepa Wistar, implantadas con cánulas guía en el NDR mediante estereotaxia. Seis días luego de la recuperación postoperatoria, los animales recibieron una microinyección de MCH (50 ng) o vehículo (salino) e inmediatamente después se registraron las VUs durante 30 min (software Avisoft). Cuantificamos el número total de VUs, *Flat* y FM y la latencia de aparición de la primer VU. Luego se realizó el TNF (5 min) y se cuantificó el tiempo de inmovilidad, nado y *climbing*.

Los resultados mostraron que los animales del grupo control emitieron VUs de 50 kHz de ambos tipos, *Flat* y FM, aunque el tratamiento con MCH tendió a disminuir las VUs totales, afectando de igual manera ambos subtipos, y aumentó la latencia de aparición de la primera VU. A su vez, observamos un aumento en el tiempo de inmovilidad (efecto pro-depresivo) inducido por MCH en el TNF.

Este trabajo demuestra que el efecto pro-depresivo de MCH evaluado en el TNF acompañado de una disminución en la emisión de VUs positivas, podría reflejar una respuesta anhedónica característica de un estado depresivo.

## 1. Introducción

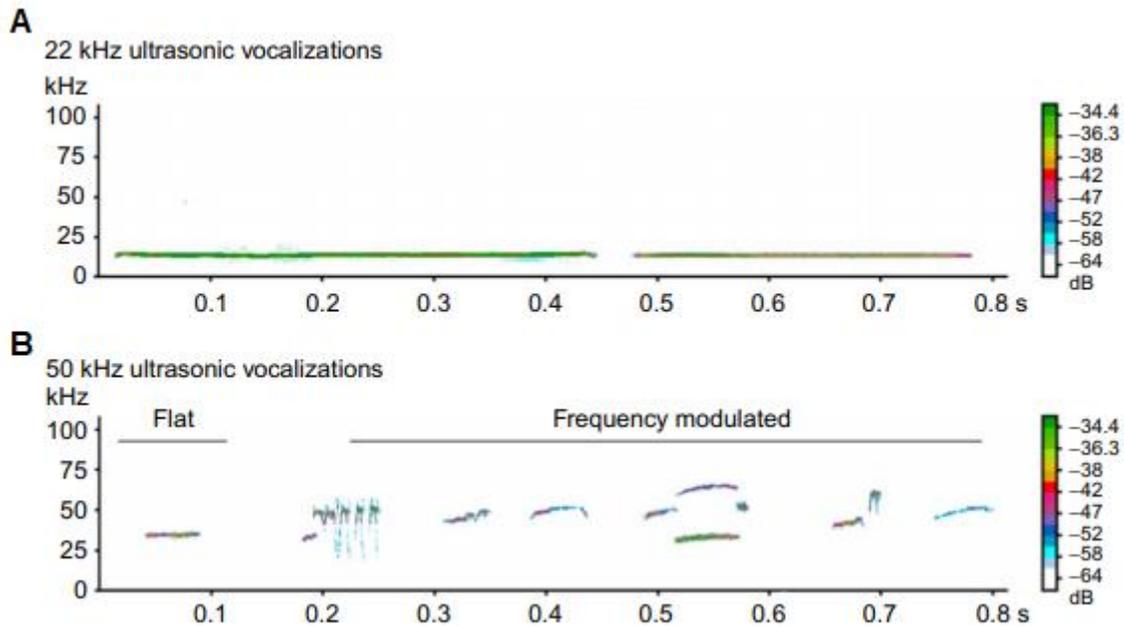
### **Vocalizaciones ultrasónicas: una herramienta para el estudio de desórdenes emocionales**

La emisión de llamadas en el rango del ultrasonido, denominadas vocalizaciones ultrasónicas (VUs) está presente en la naturaleza en una gran variedad de animales vertebrados como anfibios, aves y mamíferos (Narins et al., 2014; Brudzynski., 2014; Olson et al., 2018). La emisión de estas llamadas es una respuesta espontánea en aquellos animales que las emiten y es utilizada como medio de comunicación (Brudzynski., 2018).

Observaciones etológicas indican que este tipo de emisiones juegan un papel significativo adaptativo en animales sociales, relevante para la supervivencia (Porges y Lewis., 2009). Algunas de las funciones propuestas para las VUs incluyen funciones filiativas y de locación, mantenimiento de vínculos comunicativos/sociales entre individuos dentro de un grupo, brindar información sobre el estado emocional, así como informar sobre situaciones de alarma o peligro para promover la defensa o escape (Snowdon., 1997; Brudzynski., 2005; Tyack., 2008).

Los roedores, emiten VUs frente a diversos estímulos y se ha propuesto que el registro y análisis de las VUs en animales de experimentación podría ser una medida informativa en estudios neuroconductuales, constituyendo una herramienta etológicamente relevante (Anderson., 1953; Simola y Granon., 2018). En este sentido, el análisis de la emisión de VUs ha despertado interés por su potencial utilidad como medida o indicador de comportamientos motivados o emocionales, lo que se ve reforzado por el hecho de que la emisión de VUs es dependiente de su valencia (Brudzynski., 2013).

En ratas adultas las VUs emitidas se clasifican en dos grandes categorías en función de la frecuencia promedio en la cual se encuentran: las de 22 kHz o de baja frecuencia (Fig. 1A) y de 50 kHz o de alta frecuencia (Fig. 1B), las cuales poseen a su vez, distinta significancia comportamental, emocional y fisiológica (Simola y Brudzynski., 2018a).



**Figura 1:** Espectrogramas representativos de VUs: (A) 22 kHz y (B) 50 kHz (*Flat* y FM). Se observa la estructura acústica de cada tipo de vocalización. La escala de color del lado derecho de la figura indica la intensidad de sonido relativa de las vocalizaciones en dB (Tomado de Simola y Brudzynski., 2018a)

Las VUs de baja frecuencia o también conocidas como llamadas de alarma, se caracterizan por tener una frecuencia relativamente constante, aparecen en el rango de 18-32 kHz y son generalmente de larga duración (300-3400 ms; Portfors., 2007; Brudzynski., 2015) En situaciones experimentales, se ha observado un aumento de este tipo de vocalizaciones como respuesta a diversos estímulos estresantes o aversivos como la exposición a *foot-shocks* o situaciones de aislamiento o dolor (Tonoue et al., 1986; Barroso et al., 2019). En este contexto, la emisión de VUs de 22 kHz en respuesta a estrés ha sido propuesta como indicador de un estado de tipo-ansioso en ratas, sensible al tratamiento con drogas ansiolíticas. (Molewijk et al., 1995; Sanchez., 2003). Sin embargo, en situaciones tales como la relajación post-eyaculatoria luego del encuentro sexual, también se ha visto emisión de este tipo de VUs, asociándose a la frustración por la imposibilidad de contactar con la hembra (Bialy et al., 2019).

Por otro lado, las VUs de 50 kHz o de alta frecuencia se ubican en un rango de 35-80 kHz, tienden a ser de corta duración (10-150 ms) y aumentan ante la presencia de estímulos apetitivos como la comida o interacciones sociales recompensantes tales como el juego o el encuentro sexual, por lo que han sido asociadas con un estado emocional positivo (Brudzynski., 2007; 2013). A su vez, manipulaciones farmacológicas como la administración de

drogas de abuso que poseen un alto poder reforzador tales como anfetamina o cocaína pueden iniciar o modular la emisión de VUs de 50 kHz (Ahrens et al., 2009; Williams y Undieh., 2010). Por otra parte, existen estudios que demuestran que la tasa de emisión de este tipo de vocalizaciones disminuye frente a estímulos que generan ansiedad tales como la exposición a olor de gato, iluminación brillante o luego de la administración de drogas ansiogénicas como PTZ (6,7,8,9-tetrahydro-5H-tetrazolo[1,5-a]azepine) o mCPP (m-chlorophenylpiperazine; Panksepp y Burgdorf., 2010; Ishiyama y Brecht., 2016; Willadsen et al., 2018). A su vez, más recientemente, algunos estudios en modelos preclínicos de depresión han mostrado una disminución en la emisión de VUs de 50 kHz junto con una disminución de la preferencia en el consumo de sacarosa (repuesta de anhedonia) y un aumento de la inmovilidad en el test de nado forzado (TNF; Burgdorf et al., 2017). En este mismo sentido se vio que la lesión bilateral de la vía nigroestriatal con 6-Hidroxidopamina (modelo de enfermedad de Parkinson experimental) indujo una reducción de la preferencia de sacarosa, efecto asociado a la sintomatología tipo-depresiva de la enfermedad y disminuyó a su vez el número de emisiones de VUs de 50 kHz (Vecchia et al., 2018). Esto ha llevado a sugerir que una disminución en la emisión de VUs positivas podría ser un indicador de un estado afectivo tipo-depresivo (Burgdorf et al., 2017; Vecchia et al., 2018).

Las VUs de 50 kHz pueden a su vez, subdividirse en función de su estructura como *Flat* o de frecuencia constante y de frecuencia modulada (FM, presentan variaciones sustanciales de frecuencia en una misma vocalización) (Figura 1 B). Las *Flat* tienen una frecuencia que se encuentra entre 35-50 kHz, mientras que las FM tienen una frecuencia de entre 40-80 kHz. A su vez, las FM se han clasificado en varios subtipos en función del patrón de modulación de su frecuencia (Figura 1B; Simola y Brudzynski, 2018a) Se ha demostrado que las ratas pueden emitir vocalizaciones *Flat* o FM ante distintas situaciones. Mientras que las primeras se emiten principalmente en situaciones no recompensantes y se han asociado a señales de contacto y de coordinación social, las FM se emiten en situaciones altamente reforzadoras y motivadoras como el encuentro sexual y el juego, ya sea entre co-específicos o hetero-especifico (Burgdorf et al., 2008; Wohr et al., 2008). Sin embargo, para el caso de los distintos subtipos de emisiones FM hay aún pocos estudios que permitan identificar cuál es el papel comunicativo que desempeña cada uno de ellos y en que circunstancia específica es emitida, a excepción de las "*trill*" que se han visto con frecuencia asociadas a la administración repetida de drogas altamente reforzadoras tales como anfetamina o emitidas por un macho al explorar el sitio donde se encontraba una hembra (Ahrens et al., 2009; Mulvihill y Brudzynski., 2018)

Teniendo en cuenta estas evidencias, la cantidad y tipo de VU emitida, la variación temporal de la llamada y modificaciones de los parámetros acústicos que las describen (ancho de banda, frecuencia promedio, intensidad, entre otros) proporciona información relevante sobre la magnitud y valencia del estado afectivo/emocional del animal y la respuesta ante variables del ambiente en el que se producen, o efectos farmacológicos (Simola y Brudzynski., 2018b).

Además de un marcado valor etológico, el registro y análisis de las VUs puede combinarse con otros modelos comportamentales estandarizados para estudiar la comunicación, la recompensa y la motivación, entre otros indicadores del estado afectivo del animal sin la necesidad de un entrenamiento extenso y manipulaciones complejas (Simola y Granon., 2018).

En este sentido la cuantificación y caracterización de la emisión de VUs se ha propuesto como una poderosa herramienta en estudios preclínicos para el estudio de la neurobiología de desórdenes emocionales en los cuales hay alteraciones en el estado afectivo tales como, trastornos de ansiedad o depresión, así como para evaluar potenciales estrategias terapéuticas para estas patologías (Simola., 2015; Burgdorf et al., 2017; Shetty y Sadananda., 2017).

### **Caracterización del sistema de la Hormona concentradora de melanina (MCH) como un nuevo actor en la neurobiología de la depresión**

La hormona concentradora de melanina (MCH) es un neuropéptido que se expresa principalmente en neuronas del hipotálamo lateral y la zona *incerta* las cuales proyectan de forma amplia en el sistema nervioso central (Bittencourt et al., 1992). Estructuras que forman parte del circuito emocional tales como, la corteza prefrontal (CPF), núcleo accumbens (Nacc), amígdala (Am) y los núcleos dorsal y medial del rafe (NDR y NMR), entre otros, reciben aferencias MCHérgicas a la vez que expresan el receptor 1 para MCH (MCH-R1) único receptor funcional e inhibitorio en roedores (Lembo et al., 1999; Gao y van den Pol., 2002; Bittencourt., 2011). Esta característica anatómica del sistema MCHérgico ha llevado a proponer su participación en la regulación de estados emocionales. Apoyando esta idea, estudios funcionales han evidenciado que antagonistas MCH-R1 presentan acciones ansiolíticas y antidepresivas en diferentes modelos conductuales (Borowsky et al., 2002; Georgescu et al., 2005). Es así, que el uso de antagonistas MCH-R1 ha sido postulado como una nueva alternativa terapéutica para tratamiento de la depresión y trastornos de ansiedad (Chaki.,

2018). Sin embargo, los estudios sobre el papel de la MCH endógena en la regulación de respuestas emocionales son limitados.

Nuestro grupo de investigación está interesado en el estudio de la neurobiología de la depresión. Particularmente hemos abordado el estudio de la interacción anatómica y funcional entre el sistema MCHérgico y los núcleos serotoninérgicos NDR y NMR, teniendo en cuenta que ambos se encuentran en la base neurobiológica de esta patología y están involucrados en el mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos utilizados en la clínica (Lagos et al., 2011; López-Hill et al., 2013; Urbanavicius et al., 2014).

Mediante estudios de farmacología comportamental evaluamos el efecto de MCH administrada localmente en el NDR en el TNF y demostramos que MCH intra-NDR aumentó el tiempo de inmovilidad y disminuyó el tiempo de escalamiento o *climbing* (Lagos et al., 2011; Urbanavicius et al., 2014). Esta respuesta tipo-depresiva es contraria a la inducida por fármacos antidepresivos utilizados en la clínica cuando son evaluados en este modelo (Cryan et al., 2005). Por el contrario, el bloqueo de la acción de la MCH endógena en el NDR mediante la estrategia de inmunoneutralización (administración de un anticuerpo anti-MCH), indujo un efecto antidepresivo en el TNF demostrando que la modulación del sistema MCHérgico en el NDR modula respuestas pro- o anti-depresivas (Lagos et al., 2011). A su vez, confirmamos que la acción de MCH intra-NDR está mediada por el MCH-R1 ya que la administración previa del antagonista MCH-R1, ATC-0175, bloqueó el efecto inducido por MCH (Urbanavicius et al., 2014).

Sumado a esto, demostramos la respuesta inducida por MCH fue sensible al pre-tratamiento con los antidepresivos fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, 5-HT) o nortriptilina (inhibidor de la recaptación de noradrenalina, NA) ya que ambos previnieron la respuesta inducida por MCH en el NDR (Lagos et al., 2011; Urbanavicius et al., 2014). De igual forma, una respuesta tipo-depresiva se observó luego de la administración local de MCH en el NMR o el núcleo noradrenérgico *Locus Coeruleus* (también vinculado a la neurobiología de la depresión y su terapéutica), llevando a proponer que el sistema MCHérgico sería un actor en la neurobiología de la depresión (Lagos et al., 2011; López-Hill et al., 2013; Urbanavicius et al., 2014; Torterolo et al., 2015; Urbanavicius et al., 2018; 2019).

Interesados en el estudio de los mecanismos involucrados en las acciones conductuales de MCH demostramos, mediante ensayos de microdiálisis intracerebral que la perfusión local de MCH en el NDR disminuye las concentraciones extracelulares de 5-HT en concordancia con estudios electrofisiológicos que demostraron que MCH inhibe la actividad de neuronas 5-

HTérgicas de NDR (Devera et al., 2015; Urbanavicius et al., 2016). Teniendo en cuenta que disminuciones en la actividad de las neuronas 5-HTérgicas han sido asociadas con respuestas pro-depresivas, es posible especular que una disminución en las concentraciones extracelulares de 5-HT estaría en la base de su acción pro-depresiva en el TNF (Temel et al., 2007).

Sin embargo, extender el estudio de las respuestas conductuales tipo-depresivas inducidas por MCH y profundizar en los mecanismos subyacentes resulta de enorme trascendencia. Si bien el TNF es un modelo ampliamente utilizado para identificar acciones anti- o pro-depresivas, no refleja de manera directa el estado afectivo/emocional del animal. Un indicador directo, sería el registro de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas, constituyendo una herramienta muy valiosa para complementar nuestros resultados y avanzar en la caracterización de la respuesta afectiva inducida por MCH.

## **2. Hipótesis de trabajo**

De acuerdo a nuestros antecedentes, postulamos que el efecto pro-depresivo inducido por la modulación del sistema MCHérgico en el NDR se acompaña de alteraciones en la respuesta afectiva/emocional evidenciada mediante la disminución de la emisión de VUs de 50 kHz.

## **3. Objetivo general**

Estudiar el efecto inducido por MCH en el NDR sobre la emisión de VUs de 50 kHz en ratas.

## **4. Objetivos específicos**

**4.1.** Determinar el número de VUs de 50 kHz emitidas por la microinyección de MCH en el NDR en ratas en las que posteriormente se confirmó el efecto pro-depresivo inducido por MCH en el TNF.

**4.2.** Caracterizar las VUs de 50 kHz respecto a sus subtipos (*Flat* y *FM*) y sus características temporales de emisión.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (280-320g) provenientes del bioterio del IIBCE. Los animales fueron alojados en cajas de 50 cm x 37.5 cm x 21 cm en grupos de 5 y mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), ciclo de luz-oscuridad (7:00 AM-7:00 PM), con disponibilidad de alimentación y agua *ad libitum*. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el CEUA-IIBCE de acuerdo a la Ley Nacional de Experimentación Animal N° 18.611.

### 5.2. Drogas

MCH fue obtenida en Phoenix Pharmaceuticals (CA, USA). Fue disuelta en solución salina, fraccionada y conservada a -20 °C hasta el momento de ser utilizada.

### 5.3. Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilasina (5 mg/kg) y fueron colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, USA) para la implantación de cánulas guía (23 G; 20 mm) en el NDR. Se aplicó lidocaína como anestésico local. Las coordenadas para la implantación de las cánulas guía fueron: AP -7.6; L +3.6; DV -5.6 mm en ángulo de 30°, a partir de Bregma según el Atlas de Paxinos y Watson (2005). Las cánulas fueron aseguradas al cráneo mediante el anclaje de tres tornillos y fijadas con acrílico dental. Luego de la cirugía los animales fueron mantenidos en cajas individuales hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente devueltos a sus cajas en grupos de 3 y trasladados nuevamente al bioterio hasta la realización de los experimentos conductuales (5- 6 días).

### 5.4. Modelos Conductuales

Desde el día posterior a la cirugía y hasta la realización de los experimentos conductuales, los animales recibieron una manipulación diaria o *handling* de forma individual, y por el mismo experimentador, durante 5 minutos en el bioterio. El *handling* es una estrategia utilizada para habituar a los animales a la manipulación que se les efectuara durante el experimento, evitando la respuesta de estrés a la novedad. Esta aclimatación previa puede variar en los distintos protocolos, pero puede incluir acariciarlo, levantarlo, realizar mímicas de

juego o exponerlo a un simulacro del experimento que se realizará. El *handling* mejora el bienestar del animal y ha sido descrito además, que puede aumentar la emisión basal de VUs positivas, lo que permitiría, en este modelo detectar aumento o disminución luego de la manipulación farmacológica (Lafollette et al., 2017; Cloutier et al., 2018).

Todos los experimentos comportamentales fueron llevados a cabo en un cuarto de comportamiento con condiciones ambientales de temperatura y ciclo luz-oscuridad controladas y similares a las del bioterio. Los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento 24 h antes de los test conductuales para una correcta habituación al ambiente.

#### **5.4.1 Test del Nado Forzado (TNF)**

Consiste en la exposición del animal a dos sesiones de nado inescapable. La primera sesión denominada pre-test tiene una duración de 15 minutos. Veinticuatro horas después se lleva a cabo el test de 5 minutos de duración. Ambas se realizan mediante el uso de un cilindro de acrílico transparente con 34 cm de altura de agua a 23-24 °C. El día del test se cuantifica la duración de los siguientes comportamientos: inmovilidad, nado y escalamiento o *climbing*. Se considera que el animal se encuentra en inmovilidad cuando flota realizando los mínimos movimientos necesarios para mantener la cabeza por encima del agua sin luchar. El nado consiste en el desplazamiento, generalmente horizontal, a lo largo del cilindro. El *climbing* comprende el movimiento vertical vigoroso con las patas delanteras dirigidas hacia arriba (Cryan et al., 2005). Se considera que un aumento en el comportamiento pasivo (inmovilidad) refleja acciones pro-depresivas con la consecuente disminución en los comportamientos activos (nado y *climbing*). El TNF siempre se asocia con un test de actividad motora, debido a que los cambios comportamentales observados en el TNF pueden reflejar cambios en la locomoción de los animales dando falsos positivos o negativos. En este trabajo, se ensayó una dosis de MCH que no induce cambios en la actividad motora (Urbanavicius et al., 2014).

#### **5.4.2 Vocalizaciones Ultrasónicas (VUs)**

##### Registro de las VUs

Las VUs son emitidas en un rango de frecuencia de sonido entre 18 a 100 kHz, fuera del rango audible humano. De este modo, para registrar y oír las VUs es necesario un equipamiento electrónico específico. El mismo consiste de un micrófono ultrasónico, un dispositivo de grabación de ultrasonido (UltraSoundGate 116Hb, Avisoft Bioacoustics) y un software Avisoft RECORDER. El micrófono, que detecta frecuencias en una banda amplia que

va desde 0 a 100 kHz (CM16/CMPA; Avisoft Bioacoustics), se conecta al dispositivo de grabación de ultrasonido (UltraSoundGate 116Hb, Avisoft Bioacoustics) a través del cual se graban las VUs con el programa Avisoft RECORDER.

Durante las grabaciones, la ganancia de intensidad se mantuvo al mismo nivel para todas las ratas.

El animal se colocó en un cilindro de acrílico transparente (al cual fue habituado 24 h antes durante 10 min) en cuya parte superior (aproximadamente a 30 cm del animal) se coloca el micrófono ultrasónico.

La detección de la señal comienza con el micrófono donde el sonido es convertido a una onda de voltaje continua analógica. Esta onda pasa a través de un preamplificador o filtro que amplifica la señal y minimiza el ruido. Luego mediante un transformador análogo-digital, el voltaje analógico se convierte a números binarios en intervalos de tiempo sucesivos discretos. Luego llegan al procesador digital de señal que realiza los cálculos de algoritmos que procesa la señal medida en función del tiempo y la frecuencia. Una vez que la señal sale del procesador pasa por un preamplificador y finalmente se obtiene la grabación. Ésta se visualiza como una onda de sonido en una gráfica de amplitud en función del tiempo. A partir de esta gráfica se crea el espectrograma mediante Transformadas Rápidas de Fourier (FFT) que permite visualizar de manera gráfica las vocalizaciones como la frecuencia en función del tiempo y la amplitud se visualiza mediante una escala de color (MacDonald y Brudzynski., 2018).

### Análisis de las VUs

El análisis de las VUs se realizó mediante el software Avisoft SASLab Pro. Los espectrogramas fueron analizados visualmente, aislando las VUs del ruido de fondo. El ruido de fondo y las señales que podrían no ser unívocamente clasificadas como VUs fueron manualmente removidas del espectrograma (Simola et al., 2012).

Los espectrogramas fueron generados con una frecuencia de resolución para un FFT de 512 puntos, el tipo de ventana es Hamming y la resolución temporal configurada muestra un 75% de superposición.

De acuerdo a Brudzynski., 2015, se consideraron VUs de 50 kHz aquellas señales que fueron detectadas por encima de 35 kHz y fueron clasificadas en *Flat* o FM de acuerdo a su estructura (Brudzynski., 2015). Los parámetros que se cuantificaron fueron los siguientes: número total de VUs de 50 kHz, número de VUs *Flat* y FM, latencia de aparición de la primera VU y patrón temporal de emisión.

## 5.5. Administración intracerebral

En el día de los test comportamentales (día 6), se administró MCH (50 ng) o vehículo (salino) de forma local en el NDR mediante una cánula de administración (30 G; 21 mm) conectada a una jeringa (Hamilton, 50  $\mu$ l) y ésta a una bomba de microinyección (Harvard PHD 2000). Se administró un volumen final de inyección de 0,2  $\mu$ l a un flujo de 0,2  $\mu$ l/min. La posición final de la cánula de administración fue -6,6 mm en la coordenada dorso-ventral.

La dosis de MCH utilizada (50 ng) y el tiempo post-administración para la evaluación de su efecto, fue determinada a partir de nuestros antecedentes (Lagos et al., 2011; Urbanavicius et al., 2014).

## 5.6. Procedimiento experimental

Luego de 5 días de recuperación post-operatoria, los animales son llevados al cuarto de comportamiento y son habituados al ambiente durante una hora. Luego se procede a efectuar la rutina de *handling* durante 5 minutos e inmediatamente después ingresan al cilindro de registro de VUs (sin micrófono) durante 10 minutos para permitir su habituación al mismo. Luego que todos los animales fueron habituados al cilindro de registro comienza la sesión de pre-test del TNF.

Al día siguiente, los animales reciben MCH o vehículo (salino), e ingresan al cilindro de registro de VUs donde permanecen durante 30 minutos y se graban las VUs. Inmediatamente después los animales son expuestos al test del TNF.

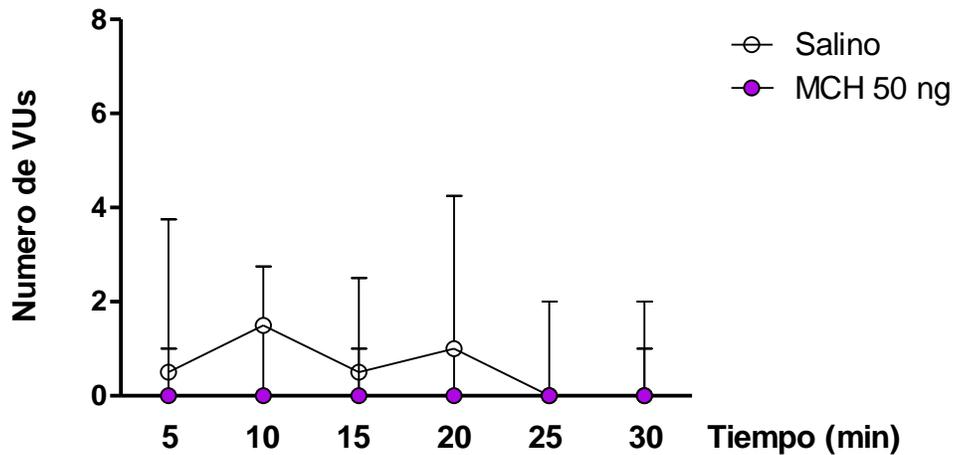
## 5.7. Localización de las cánulas

Luego de finalizados los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados, se disecaron los cerebros y se realizaron cortes coronales mediante crióstato a los efectos de verificar la correcta localización de las cánulas.

## 5.8. Análisis estadístico

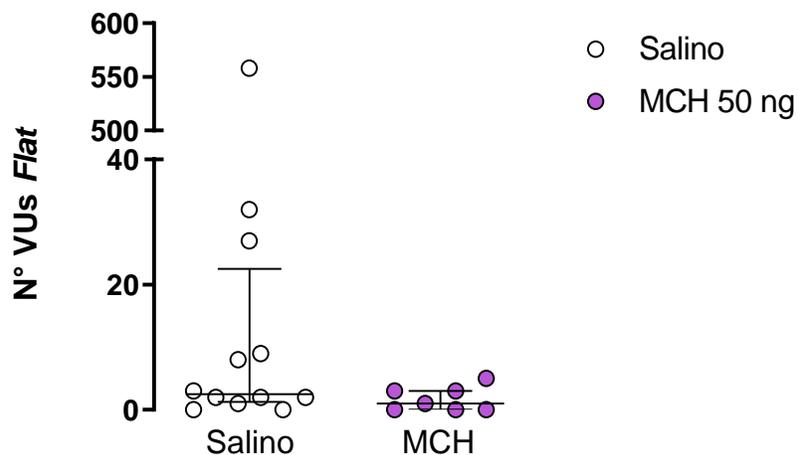
Los datos de TNF fueron analizados con el test estadístico *t* de Student y expresados como la Media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Los datos de VUs no se ajustan a una distribución normal, por lo cual fueron expresados como medianas (Rangos Intercuartiles, RIQs) y analizados con el test de Mann Whitney. Para ello utilizamos el software GraphPad Prism 5.01. La significación estadística fue establecida para  $p < 0.05$ .





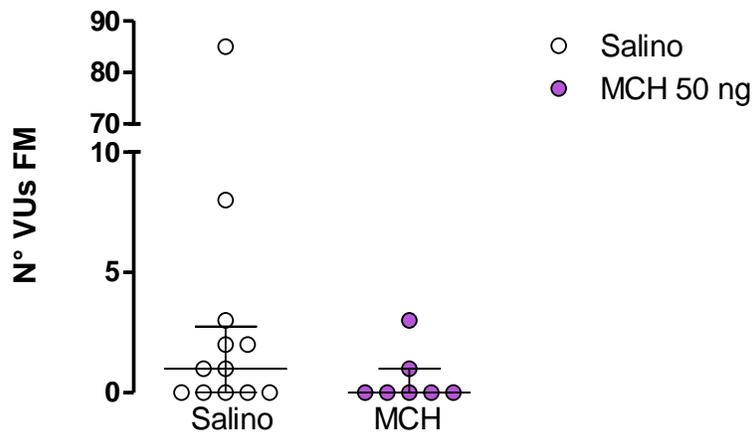
**Figura 3:** Efecto inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) sobre la emisión promedio de VUs de 50 kHz en intervalos de tiempo de 5 min. Medianas (RIQs) del número de VUs en 30 minutos de registro. Test de Mann Whitney. N=7-12.

La Figura 4 muestra el efecto del tratamiento sobre las VUs de 50 kHz de tipo *Flat*. La administración de MCH disminuyó el número de VUs *Flat* aunque esta disminución no fue significativa ( $U_{7,12} = 25,50$ ;  $p = 0,17$ ). En el grupo control, el 87 % (10:12) de los animales emitió al menos 1 vocalización de tipo *Flat*, mientras que en los animales tratados con MCH un 57 % (4:7) emitió este tipo de vocalizaciones.



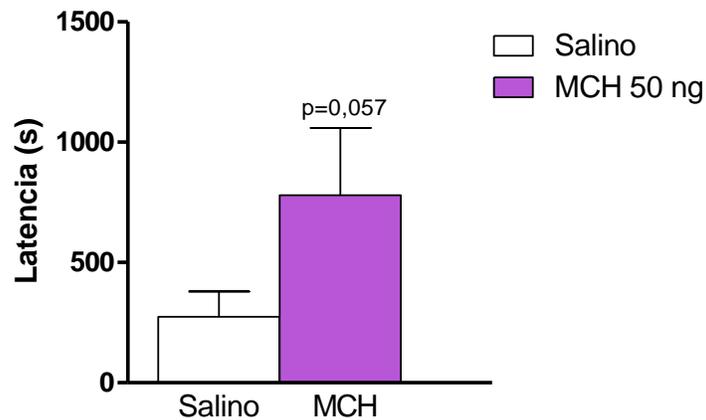
**Figura 4:** Efecto inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) o salino (vehículo) sobre la emisión de VUs del tipo *Flat* evaluadas inmediatamente luego de su administración. Medianas (RIQs) del número total de VUs *Flat* en 30 minutos de registro. Test de Mann Whitney. N=7-12.

La Figura 5 muestra el efecto del tratamiento sobre las VUs de 50 kHz de tipo FM. La administración de MCH altera la emisión de VUs de tipo FM tendiendo a su disminución ( $U_{7,12}=28,00$ ;  $p = 0,21$ ). En este grupo experimental, tan solo un 28 % (2:7) de animales emitió este tipo de vocalizaciones mientras que en el grupo control se observó que el 58 % (7:12) de los animales emitieron al menos 1 vocalización de este tipo.



**Figura 5:** Efecto inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) o salino (vehículo) sobre la emisión de VUs del tipo FM evaluadas inmediatamente luego de su administración. Medianas (RIQs) del número total de VUs FM en 30 minutos de registro. Test de Mann Whitney. N=7-12.

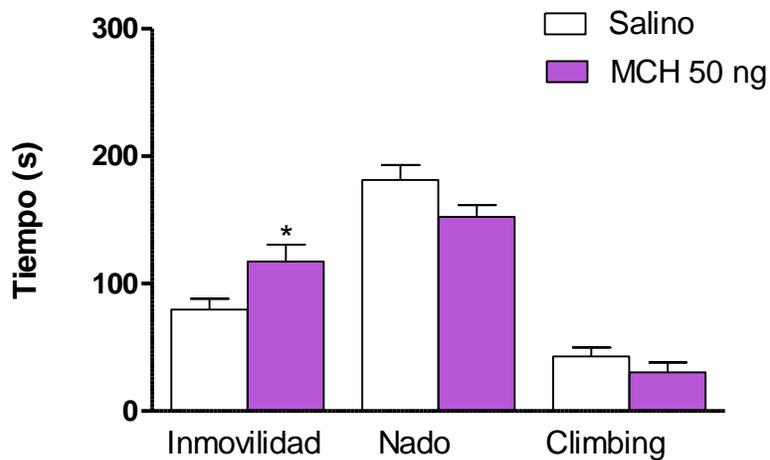
La Figura 6 muestra la latencia de aparición de la primera VUs de 50 kHz para aquellos animales que vocalizaron. Observamos que el grupo tratado con MCH en el NDR mostró una tendencia a aumentar la latencia ( $t_{(13)}=2,081$ ;  $p=0,057$ ) aunque no alcanza la significancia estadística.



**Figura 6:** Efecto inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) o salino (vehículo) en la latencia de aparición de la primera VUs de 50 kHz. Media  $\pm$  EEM. Test  $t$  de Student. N=5-10.

## 6.2. Efecto de MCH en el TNF

La Figura 7 muestra el efecto de MCH en el TNF evaluado 30 minutos luego de su administración en el NDR. Los resultados muestran un aumento significativo del tiempo de inmovilidad respecto de los animales administrados con salino ( $t_{(17)}=2,081$ ;  $p=0,021$ ). En los comportamientos activos nado y *climbing*, no se observaron diferencias significativas (nado:  $t_{(17)}=1,696$ ;  $p=0,10$ ; *climbing*:  $t_{(17)}=1,145$ ;  $p=0,26$ )



**Figura 7:** Efecto comportamental inducido por la microinyección intra-NDR de MCH (50 ng) o salino (vehículo) evaluado en el TNF 30 minutos luego de su administración. Media  $\pm$  EEM del tiempo de Inmovilidad, Nado y *Climbing*. Test  $t$  de Student, \* = vs salino; \* =  $p < 0,05$ . N=7-12.



## 7. Discusión

En este trabajo confirmamos la acción pro-depresiva de MCH, evidenciada en el TNF por el aumento en el tiempo de inmovilidad (Lagos et al., 2011; Urbanavicius et al., 2014) y evidenciamos además que esta respuesta parece ir acompañada de una disminución de la frecuencia de emisión de VUs de 50 kHz. A su vez, MCH disminuyó el número de animales que emiten vocalizaciones positivas y observamos un aumento de la latencia de aparición de la primera vocalización (Fabius y cols. 2019).

Observamos que los animales en el grupo control presentan una gran variabilidad en el nivel de emisión de VUs, resultado que coincide con lo reportado por otros trabajos. En este sentido, algunos autores postulan que existiría una predisposición individual de los animales a ser altos o bajos vocalizadores (Schwartz et al., 2007; Wöhr et al., 2008). Por otro lado, se ha reportado que factores como el *handling* o la presencia y tipo de *bedding* durante el registro pueden aumentar la tasa de emisión (Schwartz et al., 2007; Natusch y Schwartz., 2010; Cloutier et al., 2018; Silkstone y Brudzynski., 2019). Si bien, en nuestras condiciones experimentales, los animales fueron expuestos a *handling* diario (como estrategia para favorecer la emisión de VUs), no podemos descartar que, la implantación de la cánula de administración así como la exposición a la sesión de pre-test del TNF, son factores que podrían contribuir a la variabilidad en el nivel de emisión. En este sentido, la modificación de variables como el *bedding* durante el registro podría constituir una estrategia a considerar para mejorar el nivel de emisión del grupo control y poner en evidencia el efecto de MCH.

Nuestros resultados están en concordancia con estudios recientes en los cuales una disminución en el número de VUs de 50 kHz acompaña respuestas tipo-depresivas evidenciadas como un aumento en la inmovilidad en el TNF o una disminución de la preferencia de sacarosa (Borges et al., 2013; Burgdorf et al., 2017; Vecchia et al., 2018). A su vez, el aumento de la latencia de aparición a la primera vocalización se ha reportado también con la disminución en el número de vocalizaciones (Vecchia et al., 2018). Sumado a esto, la combinación del registro de emisión de VUs con el consumo de alimento dulce (estímulo reforzador) mostró que a la vez que los animales optan por el alimento dulce aumenta la emisión de VUs de 50 kHz. En este trabajo se demostró además, que el estrés crónico impredecible reduce la preferencia por el alimento dulce de manera simultánea con la disminución en la emisión de VUs, sumado a un efecto tipo-depresivo en el TNF. Todos estos resultados sugieren que esta medida puede representar un índice sensible y robusto de un estado anhedónico. De manera interesante, se sabe que el tratamiento crónico con antidepresivos revierte la disminución en la emisión de VUs de 50 kHz (Mateus-Pinheiro et al.,

2014). Estos hallazgos refuerzan la idea de que una atenuación de la emisión de VUs de 50 kHz podría ser indicador de un estado afectivo negativo o de anhedonia.

Por otra parte, si bien el número de VUs de 22 kHz ha sido utilizado como indicador de estados afectivos de tipo negativos, estudios recientes concluyen que la emisión de este tipo de VUs representa respuestas de ansiedad y no de un estado tipo-depresivo (Brudzynski, 2019). En nuestro estudio, tan sólo cuatro animales (3 en el grupo control y uno en el grupo tratado con MCH) emitieron VUs de 22 kHz, por lo cual en nuestras condiciones, no sería un parámetro representativo del estado afectivo de los animales (datos no mostrados). Asimismo, antecedentes de nuestro grupo mostraron que la acción pro-depresiva de MCH en el NDR, no se acompañó de alteraciones en la ansiedad experimental evaluada en el laberinto en cruz elevado, confirmando la acción específica de MCH sobre respuestas de tipo-depresivas (Urbanavicius et al., 2014).

En relación a los subtipos de VUs de 50 kHz *Flat* y FM, ambos se vieron afectados luego de la administración de MCH, tendiendo a disminuir, aunque el nivel de emisión VUs de tipo *Flat* (2.5 vs 1; en medianas del grupo salino y MCH respectivamente) fue levemente mayor respecto de las FM (1 vs 0; en medianas del grupo salino y MCH respectivamente). Como se mencionó anteriormente, existen diferencias en la significancia biológica de estos subtipos de VUs, donde las FM son estimuladas frente a situaciones altamente reforzadoras (Burgdorf et al., 2008; Wöhr et al., 2008; Simola., 2015). En nuestras condiciones experimentales los animales fueron previamente habituados al cuarto de experimentación y al cilindro de registro, por lo tanto, era de esperar una mayor proporción de emisiones *Flat* ya que la respuesta evaluada no se asocia con un efecto de novedad o con estímulos reforzadores.

El sistema mesolímbico, conformado por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) y sus proyecciones al Nacc, contribuyen directamente en la producción de vocalizaciones de 50 kHz y éstas se relacionan con el aumento de la liberación de dopamina (DA) en el Nacc (Hori et al., 2013; Willuhn et al., 2014). Estudios en ratas mostraron que la emisión de VUs inducida por *tickling* (*handling* de tipo “cosquillas”) se acompañó de un aumento en la liberación de DA en el Nacc evidenciado mediante microdiálisis intracerebral (Hori et al., 2013). A su vez, se evidenció mediante voltametría el aumento en la liberación de DA en el Nacc en animales expuestos a VUs de 50 kHz pre-grabadas (Willuhn et al., 2014). Este concepto es apoyado por otros trabajos que reportaron que la administración de anfetamina en el Nacc o la estimulación eléctrica del ATV aumenta la emisión de VUs positivas mientras que la lesión del ATV con 6-hidroxidopamina o la administración del antagonista

dopaminérgico D1/D2, Flupentixol, disminuye el número de VUs de 50 kHz (Burgdorf et al., 2001; 2007; Thompson et al., 2006).

Si bien aún resta por saber si MCH intra-NDR modifica la transmisión DAérgica explicando su efecto sobre las VUs, evidencias anatómicas demuestran que las neuronas 5-HTérgicas de NDR proyectan al ATV y Nacc (DiGiovani et al., 2008; Mengod et al., 2010), por lo que la administración local de MCH en el NDR podría modular distalmente la liberación de DA. Se ha visto que el sistema serotoninérgico modula la actividad de las neuronas DAérgicas del ATV, aunque los efectos son contradictorios. Mientras que algunos autores reportan que el sistema 5-HTérgico ejerce un control tónico inhibitorio moderado sobre las neuronas del ATV, otros estudios muestran que una disminución del *input* serotoninérgico, disminuye la frecuencia de disparo de las neuronas DAérgicas (DiGiovani et al., 2008; Adell et al., 2010). En este contexto, la inhibición de las neuronas 5-HTérgicas del rafe inducida por la administración local de MCH (Devera et al., 2015; Urbanavicius et al., 2016) podría inducir como consecuencia una disminución de los niveles de DA en el Nacc. No se puede descartar la modulación de las VUs de 50 kHz inducida por cambios en el sistema 5-HTérgico, independientes del sistema dopaminérgico, así como por la participación de otros sistemas de neurotransmisión tales como el noradrenérgico u opioide (Wright et al., 2012; Sadananda et al., 2012; Hamed et al., 2015; Grant et al., 2018). En este sentido, hemos demostrado previamente que además de la modulación de la neurotransmisión 5-HTérgica MCH provoca cambios en la transmisión noradrenérgica (Urbanavicius et al., 2014; 2019) que podrían también influir en la disminución de la VUs. De este modo la profundización en el estudio de los mecanismos subyacentes a la alteración en la emisión de VUs de 50 kHz resulta de gran relevancia.

## **8. Conclusiones**

Los resultados de este trabajo muestran que el efecto pro-depresivo de MCH identificado en el TNF se acompaña de una disminución en la frecuencia de emisión de VUs de 50 kHz y un aumento en la latencia de aparición de la primera vocalización. Esta respuesta comportamental es opuesta a la que se esperaría para un estímulo motivacional o apetitivo. Por lo tanto, la disminución en la emisión de VUs positivas podría reflejar un efecto anhedónico, el cual es característico de un perfil comportamental de tipo depresivo.

## 9. Perspectivas

Este trabajo de pasantía permitió la puesta a punto y el adiestramiento a un modelo conductual complementario a los ya existentes en nuestro laboratorio. Sin embargo, es necesario profundizar en las condiciones o variables que permitan una mayor emisión de vocalizaciones, así como la disminución de la variabilidad en la respuesta. Por lo tanto, una primera perspectiva de este trabajo se basa en modificar las condiciones experimentales para aumentar el número basal de emisiones y la variabilidad en los animales controles. Se ha reportado que colocar viruta de su propia caja en el cilindro donde se graban las VUs podría ser una estrategia para mejorar estos parámetros.

En segundo lugar, el conocimiento de los mecanismos que expliquen el perfil tipo-anhedónico inducido por MCH permitirá avanzar en el papel de éste neuropéptido en la neurobiología de la depresión. Por lo tanto, determinar los niveles extracelulares de dopamina en el NAcc luego de la administración de MCH en el NDR mediante la técnica de microdiálisis intracerebral, sería uno de los experimentos planificados. De este modo, esperaríamos que la administración de MCH en el NDR provocara una disminución de los niveles de dopamina. Alternativamente, se podría administrar MCH directamente en el Nacc y evaluar si ésta provoca una disminución en la emisión de las VUs de 50 kHz.

En tercer lugar, una manera de confirmar el efecto de MCH sobre la emisión de las VUs sería a través de la determinación de la respuesta en presencia de un antagonista MCH-R1 (ATC0175).

Por último, una estrategia que permitiría evidenciar el efecto pro-depresivo de MCH podría ser estimulando la emisión de VUs mediante *tickling* (cosquillas) y evaluar el efecto de la administración de MCH intra-NDR.

## 10. Bibliografía

- Adell, A., Bortolozzi, A., Díaz-Mataix, L., Santana, N., Celada, P., Artigas, F. (2010). Serotonin Interaction with Other Transmitter Systems. Muller, C.P., Jacobs. B.L. Eds, Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin. Academic Press. London. 259-276.
- Anderson, J. W. (1953). The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. *Science*. 119, 808-809.
- Ahrens, A., Ma, S. T., Maier, E. Y., Duvauchelle, C. L., Schallert, T. (2009). Repeated intravenous amphetamine exposure: Rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behav. Brain Res.* 197 (1), 205-209.
- Barroso, A. R., Araya, E. I., De Souza, C. P., Andreatini. R., Chichorro, J. G. (2019). Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: Influence of the social context. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 29 (11), 1213-1226.
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol. Exp.* 79, 1-12.
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* 319 (2), 218–45.
- Bittencourt, J. C. (2011). Anatomical organization of the melanin- concentrating hormone peptide family in the mammalian brain in the mammalian brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172,185-197.
- Borges, S., Coimbra, B., Soares-Cunha, C., Pego, J. M., Sousa, N., Rodrigues, A. J. (2013). Dopaminergic Modulation of Affective and Social Deficits Induced by Prenatal Glucocorticoid Exposure. *Neuropsychopharmacol.* 38 (10), 2068-2079.
- Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K., Marzabadi, M.R., DeLeon, J., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., Blackburn, T.P., Branchek, T.A., Gerald, C., Vaysse, P.,

Forray, C. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat Med.* 8 (8), 825-30.

Brudzynski, S. M. (2005). Principles of rat communication: Quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet.* 35, 85-92.

Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.* 182 (2), 261-273.

Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Op. Neurobiol.* 23 (3), 310-317.

Brudzynski, S. M. (2014). Social Origin of Vocal Communication in Rodents. *Biocommunication of Animals*. Witzany, G. Eds. Springer International Publishing, Switzerland. 63-79.

Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 180-192.

Brudzynski S. M. (2018) Handbook of ultrasonic vocalization, a window into the emotional brain. (Ed.) Academic Press, Amsterdam.

Brudzynski, S. M. (2019). Emission of 22 kHz vocalizations in rats as an evolutionary equivalent of human crying: Relationship to depression. *Behav. Brain. Res.* 363:1-12

Burgdorf, J., Knutson, B., Pankseep, J., Ikemoto, S. (2001). Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav. Neurosci.* 115 (4), 940-944.

Burgdorf, J., Wood, P.L., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Panksepp, J. (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav. Brain. Res.* 182, 274-283.

Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol*, 122(4), 357–367.

Burgdorf, J., Colechio, E. M., Stanton, P., Panksepp, J. (2017). Positive Emotional Learning Induces Resilience to Depression: A Role for NMDA Receptor-mediated Synaptic Plasticity. *Curr. Neuropharmacol.* 15 (1), 3-10.

Chaki, S. (2018). MCH Receptor 1 Antagonists: Antidepressant/Anxiolytic Potential in Animal Models. Pandi-Perumal, Torterolo and Monti Eds. *Melanin-Concentrating Hormone and Sleep. Molecular, functional and clinical aspects.* Springer International Publishing, Switzerland. 207-225.

Cloutier, S., LaFollette, M.R., Gaskill, B.N., Panksepp, J., Newberry, R.C. (2018). Tickling, a Technique for Inducing Positive Affect When Handling Rats. *J. Vis. Exp.* (135), e57190.

Cryan, J.F., Valentino, R., Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 547-569

Devera, A., Pascovich, C., Lagos, P., Falconi, A., Sampogna, S., Chase, M.H., Torterolo, P. (2015). Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 1598, 114-28.

Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., Esposito, E. (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 172, 45-71.

Fabius, S., Urbanavicius, J., Prieto, J. P., Torterolo, P., Scorza, C. (2019). Caracterización de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas en ratas como indicador de un estado tipo-depresivo. Poster, II Congreso Nacional de Biociencias.

Gao, X.B., van den Pol, A.N. (2002) Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. *J Physiol.* 542, 273–286.

Georgescu, D., Sears, R.M., Hommel, J.D., Barrot, M., Bolaños, C.A., Marsh, D.J., Bednarek, M.A., Bibb, J.A., Maratos-Flier, E., Nestler, E. J., DiLeone, R.J. (2005). The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J Neurosci.* 25 (11), 2933-2940.

Grant, L. M., Barth, K. J., Muslu, C., Kelm-Nelson, C. A., Bakshi, V. P., Ciucci, M. R. (2018). Noradrenergic receptor modulation influences the acoustic parameters of pro-social rat ultrasonic vocalizations. *Behav. Neurosci.* 132, 269-283.

Hamed, A., Szyndler, J., Taracha, E., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., Krząścik, P., Daszczuk, P. (2015).  $\kappa$ -opioid receptor as a key mediator in the regulation of appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacol.* 232 (11), 1941-1955.

Hori, M., Shimoju, R., Tokunaga, R., Ohkubof, M., Miyabec, S., Ohnishia, J., Murakamia, K., Kurosawad, M. (2013). Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. *NeuroReport.* 24, 241–245.

Ishiyama, S., Brecht, M. (2016) Neural correlates of ticklishness in the rat somatosensory cortex. *Science.* 354 (6313), 757-760.

Lagos, P., Urbanavicius, J., Cecilia, M., Miraballes, R., & Torterolo, P. (2011). Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behav. Brain Res.* 218 (2), 259-266.

LaFollette, M.R., O'Haire, M.E., Cloutier, S., Blankenberger, W.B., Gaskill, B.N. (2017). Rat tickling: A systematic review of applications, outcomes, and moderators. *PLoS ONE* 12 (4): e0175320.

Lembo, P.M., Grazzini, E., Cao, J., Hubatsch, D.A., Pelletier, Hoffert, M.C., St-Onge, S., Pou, C, Labrecque, J., Groblewski, T., O'Donnell, D., Payza, K., Ahmad, S., Walker, P. (1999). The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat Cell Biol.* 1, 267-271.

López Hill, X., Pascovich, C., Urbanavicius, J., Torterolo, P., Scorza, M.C. (2013). The median raphe nucleus participates in the depressive-like behavior induced by MCH: differences with the dorsal raphe nucleus. *Peptides* 50, 96-99.

MacDonald, T., Brudzyński, S.M. (2018). Ultrasonic Vocalizations, Their Recording, and Bioacoustic Analysis. Brudzynski S. M. (Ed.), *Handbook of Ultrasonic Vocalization. A window into the emotional brain.* Academic Press, Amsterdam, 7-19.

- Mateus-Pinheiro, A., Patricio, P., Alves, N. D., Machado- Santos, A. R. Morais, M. Bessa, J. M. Sousa, N. Pinto, L. (2014). The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Front. Behav. Neurosci.* 8 (74), 1-10.
- Mengod, G., Cortes, R., Vilaro, M.T., Hoyer, D. (2010). Distribution of 5-HT receptors in the central nervous system. Muller, C.P., Jacobs. B.L. Eds, *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. Academic Press. London. 123–139
- Molewijk, H. E., Van der Poel, A. M., Mos, J., Van der Heyden, J. A. M., Olivier, B. (1995). Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioural paradigm for screening anti-panic drugs. *Psychopharmacol.* 117, 32-40.
- Mulvihill, K.G., Brudzynski, S.M (2018). Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiol. Behav.* 196, 200-207.
- Narins, P. M., Wilson, M., Mann, D. A. (2014). Ultrasound detection in fishes and frogs: Discovery and mechanisms. En Koppl, C. Manley, G. A., Popper, A. N., Fay, R. R. (Eds.), *Springer handbook of auditory research: 49. Insights from comparative hearing research*. New York. 133-156.
- Natusch, C., Schwarting, R.K.W. (2010). Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96 (3), 251-259.
- Olson, C., Fernandez-Vargas, M., Portfors, C. V., Mello, C. V. (2018). Black Jacobin hummingbirds vocalize above the known hearing range of birds. *Curr. Biol.* 28, 204-205.
- Pankseep, J., Burgdorf, J. (2010). Laughing Rats? Playful Tickling Arouses High-Frequency Ultrasonic Chirping in Young Rodents. *Am. J. Play.* 2 (3), 357-372.
- Paxinos G., Watson C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Sydney: Academic Press.
- Porges, S.W., Lewis, G.F. (2009). The polyvagal hypothesis: common mechanisms mediating autonomic regulation, vocalizations and listening. *Handbook of Mammalian Vocalization: An Integrative Neuroscience Approach*. Brudzynski Eds. Academic Press; London. 255–264.

Portfors, C.V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46(1), 28-34.

Sadananda, M., Natuscha, C., Karren, B., Rainer, B., Schwarting, K.W. (2012). 50-kHz calls in rats: Effects of MDMA and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav.* 101 (2), 258-264.

Sanchez, C. (2003). Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? *Neuropharmacol.* 463, 133– 143.

Schwarting, R.K.W, Jegan, N., Wohr, M. (2007). Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 182 (2), 208-222.

Shetty, R. A., Sadananda, M. (2017). Immediate and delayed anxiety-and depression-like profiles in the adolescent Wistar-Kyoto rat model of endogenous depression following postweaning social isolation. *Behav. Brain Res.* 320, 323-332.

Simola, N., Fenu, S., Costa, G., Pinna, A., Plumitallo, A., Morelli, M. (2012). Pharmacological characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: comparison of the effects of different psychoactive drugs and relevance in drug-induced reward. *Neuropharm.* 63 (2), 224-34.

Simola, N. (2015). Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. *Curr Neuropharmacol.* 13 (2), 164-179.

Simola, N., Brudzynski, S. (2018a). Repertoire and Biological Function of Ultrasonic Vocalizations in Adolescent and Adult Rats. *Handbook of behavioural neuroscience*, 177-186.

Simola, N., Brudzynski, S. (2018b). Rat 50-kHz ultrasonic vocalizations as a tool in studying neurochemical mechanisms that regulate positive emotional states. *J. Neurosci. Methods.* 310, 33-44.

Simola, N., Granon, S. (2018). Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharm.* 159, 107420.

Silkstone, M., Brudzynski, S.M. (2019). Dissimilar interaction between dopaminergic and cholinergic systems in the initiation of emission of 50-kHz and 22-kHz vocalizations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 172815.

Snowdon, C.T., (1997). Affiliative processes and vocal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 340- 351.

Temel, Y., Boothman, L. J., Blokland, A., Magill, P.J., Steinbusch, H.W., Visser-Vandewalle, V., Sharp, T. (2007). Inhibition of 5-HT neuron activity and induction of depressive-like behavior by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (43), 17087-17092.

Thompson, B., Leonard, K. C., Brudzynski, S. M. (2006). Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behav. Brain Res.* 168 (1), 64-73.

Tonoue, T., Ashida, Y., Makino, H., Hata, H. (1986). Inhibition of shock elicited ultrasonic vocalization by opioid peptides in the rat: a psychotropic effect. *Psychoneuroendocrinol.* 11(2), 177-184.

Tortorolo P., Scorza C., Lagos P., Urbanavicius, J., Benedetto, L., Pascovich, C., Lopez-Hill, X., Chase, M.H., Monti, J.M. (2015). Melanin-concentrating hormone (MCH): Role in REM sleep and depression. *Front Neurosci.* 9, 1-13.

Tyack, P.L., (2008). Convergence of calls as animals form social bonds, active compensation for noisy communication channels, and the evolution of vocal learning in mammals. *J. Comp. Psychol.* 122, 319-331

Urbanavicius, J., Lagos, P., Tortorolo, P., Scorza, C. (2014). Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe: time course, dose dependence, effects on anxiety-related behaviors and reversion by nortriptyline, *Behav. Pharmacol.* 25 (4), 316-324.

Urbanavicius J, Lagos P, Tortorolo P, Abin-Carriquiry JA (2016). Melanin-concentrating hormone projections to the dorsal raphe nucleus: an immunofluorescence and in vivo microdialysis study. *J Chem Neuroanat.* 72, 16–24.

Urbanavicius, J., Lagos, P., Lopez, X., Torterolo, P., Scorza, C. (2018). MCH and depression. Pandi-Perumal, Torterolo and Monti Eds. Melanin-concentrating Hormone and sleep: molecular, functional and clinical aspects Springer International Publishing, Switzerland. 195-206.

Urbanavicius, J., Fabius, S., Roncalho, A., Joca, S., Torterolo, P., Scorza, C. (2019). Melanin-concentrating hormone in the Locus Coeruleus aggravates helpless behavior in stressed rats. *Behav. Brain. Res.* 374, 112120

Vecchia, D., Kanazawa, L., Wendler, E., Hocayen, P., Bruginski, E., Campos, F., Stern, C., Vital, M., Miyoshi, E., Wöhr, M., Schwarting, R., Andreatini, R. (2018). Effects of ketamine on vocal impairment, gait changes, and anhedonia induced by bilateral 6-OHDA infusion into the substantia nigra pars compacta in rats: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 342, 1-10.

Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R.K., Spruijt, B., (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol. Behav.* 93, 766-776.

Wright, J., Dobosiewicz, M. R. S., Clarke, P. B. S. (2012)  $\alpha$ - and  $\beta$ -Adrenergic Receptors Differentially Modulate the Emission of Spontaneous and Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Adult Rats. *Neuropsychopharmacol.* 37, 808–821

Willadsen, M., Best, L.M., Wöhr, M., Clarke, P.B.S. (2018). Effects of anxiogenic drugs on the emission of 22- and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult rats. *Psychopharmacol.* 235 (8), 2435–2445

Williams, S., Undieh, A. S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor signaling modulates cocaine induction of reward-associated ultrasonic vocalization in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 332, 463-468.

Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M.J., Hart, A.S., Hollon, N.G., Phillips, P.E.M., Schwarting, R.K.W., Wöhr, M. (2014). Phasic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens in Response to Pro-Social 50 kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. *J. Neurosci.* 34 (32), 10616 –10623.