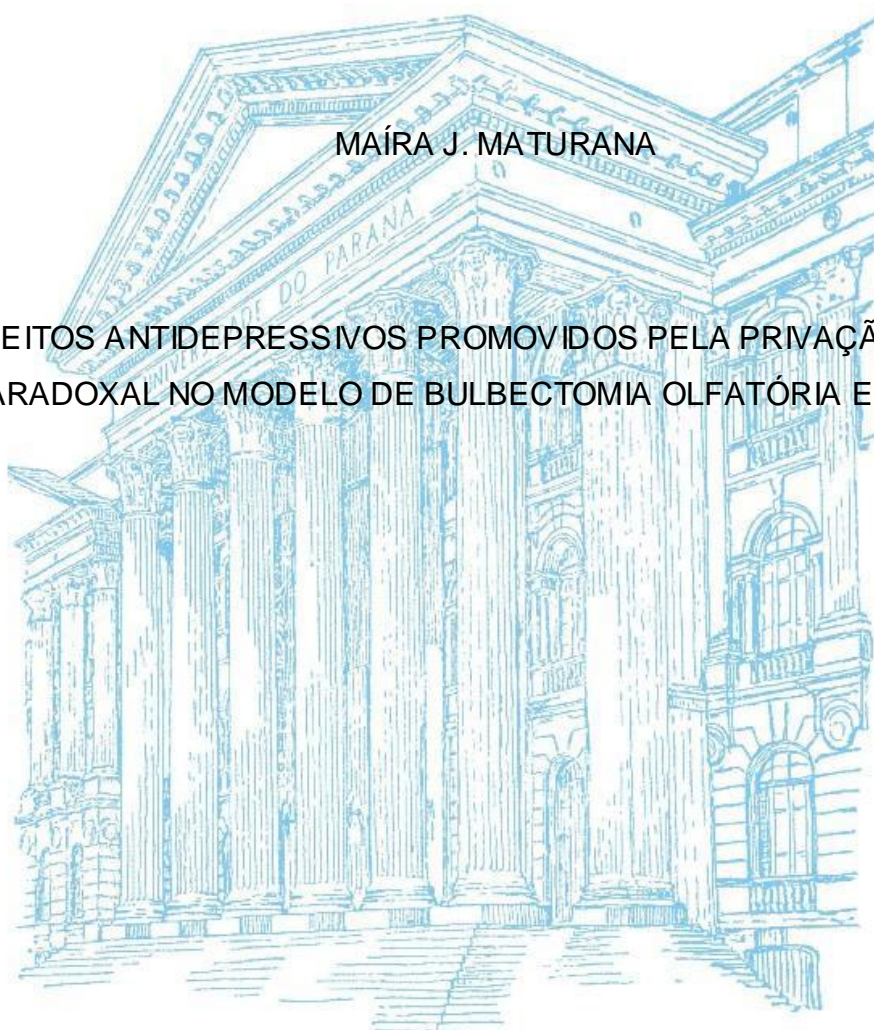


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAÍRA J. MATURANA

EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS PROMOVIDOS PELA PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL NO MODELO DE BULBECTOMIA OLFATÓRIA EM RATOS.



CURITIBA
2013

MAÍRA J. MATURANA

EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS PROMOVIDOS PELA PRIVAÇÃO DE SONO
PARADOXAL NO MODELO DE BULBECTOMIA OLFATÓRIA EM RATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de mestre em Fisiologia, curso de
Pós-graduação em Fisiologia, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo M. S. Lima

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Anete Curte Ferraz

CURITIBA
2013



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da defesa de dissertação de mestrado de MAÍRA JAQUELINNY MATURANA

Ao dezenove dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Maíra Jaquelinny Maturana**, intitulada “**EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS PROMOVIDOS PELA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL NO MODELO DE BULBECTOMIA OLFATÓRIA EM RATOS**”. A abertura teve início às 14h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima passou a palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Roberto Andreatini do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APROVAÇÃO”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Marcelo de Meira Santos Lima, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 19 de setembro de dois mil e treze.

Professor Doutor Roberto Andreatini
UFPR- Membro Titular

Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia




PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **MAÍRA JAQUELINNY MATURANA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

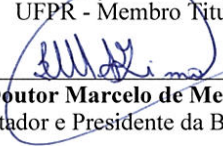
Curitiba, 19 de setembro de 2013.



Professor Doutor Roberto Andreatini
UFPR- Membro Titular



Professor Doutor Fernando Mazzilli Louzada
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Enfim acabou, ou quase, pois ainda falta a defesa, mas um grande caminho já foi percorrido e a maior parte do todo já foi desenvolvida. Fácil todos nós sabemos que não foi, mas a força que me fez seguir em frente foi maior que as dificuldades que encontrei pelo caminho, força essa que Deus me enviou nas suas mais variadas formas. Portanto, tenho a agradecer somente a Deus, pois foi Ele quem me deu minha família, quem escolheu meus amigos, quem providenciou meus professores, meus alunos, quem sugeriu meu orientador, e quem colocou em minha vida pessoas desconhecidas e seus familiares que de alguma forma eu tive a oportunidade de ajudá-los e eles de me ajudarem, estes foram ou são meus pacientes. Portanto a essas pessoas que Deus colocou em minha vida ou eu na vida delas, irei agradecê-las devidamente.

Primeiramente quero agradecer a minha mãe Maria de Lourdes B. Maturana e ao meu pai Pedro Maturana, por terem me dado todas as oportunidades de chegar até aqui, por terem me dado à educação, o estudo, por terem acreditado em mim e terem feito com que eu acreditasse também, por me incentivarem a continuar ou a desistir, tanto faz, se essa fosse a minha escolha. Mas, ainda bem que o incentivo a seguir a diante foi maior e hoje cá estou para lhes agradecer.

Obrigada também a minha irmã Verlaine Maturana, que compartilhou comigo as alegrias, as angustias, o mau humor, as pesquisas, as aulas, os seminários, a escrita e a formatação que envolvem a realização de um mestrado, mas sempre tínhamos uma à outra, seja na alegria ou na tristeza. Não só ela, mas também meu cunhado Daniel Martins Perucci, esse sim compartilhando mais o mau humor e das dificuldades em lidar com a informática, os gráficos a numeração das páginas, deram muito trabalho.

Quero aqui citar e agradecer duas pessoas em especial, a primeira fez a ligação entre o sonho e a realidade, Vera Scapin, a qual foi a responsável pelo meu ingresso no programa, me apresentando ao Professor e hoje meu orientador Marcelo Lima, que quero agradecer imensamente por ter me acolhido, uma pessoa da qual não conhecia, mas mesmo assim apostou suas fichas e me aceitou como orientanda. Obrigada Prof. Dr. Marcelo Lima por ter me dado esta oportunidade e por ter aberto as portas do laboratório, tornando possível a realização deste

trabalho, muito obrigada! A segunda pessoa é Claudia Pudell, que em um belo dia acordou com vontade de realizar um trabalho envolvendo sono e bulbectomia, foi assim que nasceu o que hoje é minha dissertação de mestrado. Também não posso deixar de agradecer a Prof. Dr Anete Ferraz, que com sua calma e paciência sempre tinha uma palavra amiga que me fazia continuar acreditando que tudo isso era possível. Agradecer aos companheiros de laboratório Bruno Carabelli, Marco Aurélio Mori, Ana Márcia Delattre, Adriano Targa Dias Santos, Laís Soares Rodrigues, Mariana Proença, Mariana Fortes onde todos foram decisivos para realização desta pesquisa. Tenho certeza que se vocês não estivessem lá, nunca saberia como anestésiar o rato, colocar no estereotáxico, HPLC (o que é isso?), sem vocês me escutando no laboratório nada disso seria possível.

Enfim, quero agradecer aqueles que indiretamente, e com muito brilhantismo, estiveram sempre ao meu lado durante toda essa caminhada, difícil aqui é citar nomes, pois foram tantos os amigos (as) que compartilharam de todo o processo que tenho medo de esquecer injustamente de algum nome, portanto, você meu amigo (a) foi a parte do “vai dar certo”, quando tudo dava errado, ou do “eu sabia que você conseguiria” quando nem eu mesma acreditava. Afinal amigo é pra essas coisas!! Muito obrigada a você meu amigo (a) !!

Não posso deixar de agradecer àqueles que fazem parte da Prófsio, empresa na qual trabalho, especialmente a equipe atuante no INC, que está repleta de pessoas que sempre me apoiaram na realização deste sonho, não importando se eu iria hoje ao trabalho ou a UFPR, se eu iria chegar no horário ou me atrasar, se a reunião iria ser adiada para que eu pudesse terminar um experimento ou não, enfim a compreensão de todos os envolvidos foi soberana, sempre! Afinal, como é fazer um mestrado? E então faço minhas as suas palavras Dr. Esperidião Elias Aquim “É como andar em uma montanha russa, no início você tem medo, mas quando você chega ao fim quer ir de novo e de novo e de novo....”.

A curiosidade e a busca pelo conhecimento sempre me impulsionaram a seguir a diante e a buscar respostas para minhas perguntas, perguntas essas que surgiam diariamente, direta ou indiretamente em minha rotina de trabalho tanto pelos meus pacientes quanto pelos meus alunos. Foram estes dois personagens, pacientes e alunos, os maiores responsáveis por eu ter buscado um programa de mestrado que poderia me auxiliar a responder todas essas dúvidas me auxiliando a formar novos profissionais e agregando conhecimento para que eu pudesse exercer minha

profissão com mais conhecimento específico, sendo assim agradeço a todos por me instigarem a ir além.

Aos ratos que viveram e morreram em prol da ciência, obrigada!

Enfim...

" Todo sacrifício é temporário, mas as vitórias são para sempre!!"

(Roberto Shinyashiki)

&

" Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

(Cora Coralina)

Fim!

RESUMO

O sono parece apresentar uma relação bi-direcional com os transtornos depressivos, onde a ocorrência de distúrbios do sono bem como de depressão parecem agravar-se e retroalimentar-se mutuamente, onde pessoas com risco para a depressão podem apresentar reduções de latência para o sono REM e densidade mais elevada dos movimentos oculares. Portanto a privação de sono REM parece ter um papel relevante para a melhora dos sintomas depressivos. O estudo atual teve como objetivo investigar os possíveis efeitos antidepressivos promovidos pela privação de sono paradoxal (PSP), em animais submetidos à bulbectomia olfatória (OBX), através de análises comportamentais, moleculares e neuroquímicas. Realizamos cirurgias extereotáticas para retirada dos bulbos olfatórios em ratos Wistar machos, os quais após o período de recuperação realizaram os testes comportamentais do campo aberto (CA) e natação forçada (NF) e foram submetidos à PSP por 72 h, repetindo os testes comportamentais após este período. Um grupo de animais foi decapitado e outro passou por um período de sono rebote (REB) de 24 h os quais realizaram novamente os testes comportamentais e posteriormente decapitados. Os animais bulbectomizados (OBX) demonstraram comportamentos tipo-depressivos no teste do campo aberto, os quais foram revertidos após a PSP e perpetuando-se após o REB. Os níveis hipocámpais de serotonina (5-HT) aumentaram significativamente no grupo OBX após a PSP e após o REB, assim como um aumento também significativo do BDNF nigral após a PSP, mantendo-se elevado também durante o REB. Entretanto, esses efeitos antidepressivos parecem ocorrer apenas mediante a presença de um insulto gerador de alterações (moleculares e comportamentais) que mimetizem a depressão, como a bulbectomia olfatória.

Palavras-chaves- Privação de sono, depressão, BDNF, bulbectomia olfatória.

ABSTRACT

Sleep seem provide a bi-directional relation with depressive disorders, where the occurrence of sleep disorders as well as depression seem worse and feedback for each other, where people at risk for depression may show reductions in sleep latency REM and higher density of eye movements. Therefore REM sleep deprivation seems to have a major role for the improvement of depressive symptoms. The present study aimed to investigate the possible antidepressant effects promoted by paradoxical sleep deprivation (PSD) in animals subjected to olfactory bulbectomy (OBX) through behavioral, molecular and neurochemical assays. stereotactic surgery are performed to remove the olfactory bulbs in male Wistar rats, which after the recovery time realized the behavioral test open field (OF) and modified forced swim test (MFST) and underwent PSD for 72 h, after repeating the behavioral tests this period. One group of animals were decapitated and another went through a period of sleep recovery (REB) for 24 h which again made behavioral tests and later decapitated. The animals bulbectomized (OBX) showed depressive-like behaviors in the open field test, which were reversed after PSD and perpetuating itself after the REB. The levels of serotonin (5-HT) in the hippocampus, increased significantly in group OBX after the PSD and after the REB, and also significantly increased BDNF nigral after the PSD also remained elevated throughout the REB. However, these antidepressant effects appear to occur only under the presence of an insult generator alterations (molecular and behavioral) that mimize the depression as olfactory bulbectomy.

Keywords – Sleep deprivation, depression, BDNF, olfactory bulbectomy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM HIPNOGRAMA DAS FASES DO SONO DE ONDAS LENTAS E REM DURANTE UMA NOITE DE SONO.....	18
FIGURA 2- SISTEMA ATIVADOR RETICULAR ASCENDENTES.....	20
FIGURA 3- EFEITOS ANTI-DEPRESSIVOS SINÉRGICOS PROMOVIDOS PELA SERTRALINA E PRIVAÇÃO DE SONO TOTAL EM PACIENTES DEPRESSIVOS.....	24
FIGURA 4- DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
FIGURAS 5- COORDENADAS DA CIRURGIA PARA RETIRADA DO BULBO OLFATÓRIO.....	31
FIGURA 6- RESULTADOS DO TESTE CAMPO ABERTO.....	38
FIGURA 7- RESULTADOS DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA.....	40
FIGURA 8- RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DO BDNF (NG/MG) NA SUBSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA.....	41
FIGURA 9- RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA, METABÓLITOS E DE SEUS <i>TURNOVERS</i>	43
FIGURA 10- RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DO NEUROTRANSMISSOR SEROTONINA, METABÓLITOS E DE SEUS <i>TURNOVERS</i>	45
FIGURA 11- RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DO NEUROTRANSMISSOR NORADRENALINA, METABÓLITOS E DE SEUS <i>TURNOVERS</i>	47
FIGURA 12- QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DO NEUROTRANSMISSOR DOPAMINA, METABÓLITOS E DE SEUS <i>TURNOVERS</i>	49
FIGURA 13- QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DO NEUROTRANSMISSOR SEROTONINA, METABÓLITOS E DE SEUS <i>TURNOVERS</i>	51

FIGURA 14- QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DO
NEUROTRANSMISSOR NORADRENALINA, METABÓLITOS E DE SEUS
TURNOVERS.....**53**

FIGURA 15- CORRELAÇÕES DE PEARSON ENTRE DIFERENTES
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS OBTIDOS APÓS
O PERÍODO DE PSP E REB DOS GRUPOS SHAM E OBX.....**56**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CORRELAÇÕES DE PERSON ENTRE DIFERENTES PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

REM- sono dos movimentos oculares rápidos

EEG- eletroencefalograma

EOG- eletrooculograma

Hz- Hertz

NA- noradrenalina

ACh- acetilcolina

5HT- serotonina

DA- dopamina

LC- locus ceruleus

TMN- tuberomamilar

BF- prosencéfalo basal

vPAG- substância cinzenta periaquedutal ventral

NREM- sono de ondas lentas

ANOVA: Analysis of variance

BDNF- fator neurotrófico derivado do cérebro

SNpc- substância negra pars compacta

OBX- Bulbectomia olfatória

PSP- privação de sono paradoxal

REB- sono rebote

GABA- gama-amino-butírico

His- histamina

LH- hipotálamo lateral

OMS- Organização Mundial da Saúde

NF- Natação forçada

CA- Campo Aberto

DOPAC- dihidroxifenilacético

HVA- ácido homovanílico

5-HIAA- ácido 5-hidroxiindolacético

DHPG- dihydroxyphenylglycol

HPLC- cromatografia de fase reversa de elevado desempenho líquida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	IMPORTÂNCIA GERAL DO SONO	16
1.2.	NEUROFISIOLOGIA DO SONO E SUA ARQUITETURA.....	17
1.3.	NEUROTRANSMISSÃO DO CICLO VIGÍLIA-SONO	18
1.4.	INFLUENCIA DO SONO NA REGULAÇÃO DO HUMOR E NA DEPRESSÃO.....	21
1.4.1	PAPÉIS DO FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF) NA DEPRESSÃO E NO SONO.....	23
1.4.2	BULBECTOMIA COMO MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO	25
1.5.	PRIVAÇÃO DE SONO COMO UMA TERAPIA ANTI-DEPRESSIVA.....	26
2.	JUSTIFICATIVA	28
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1.	OBJETIVO GERAL	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	ANIMAIS.....	30
4.2.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
4.3.	BULBECTOMIA OLFATÓRIA	31
4.4.	TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA.....	32
4.5.	TESTE DO CAMPO ABERTO	32
4.6.	PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL	33
4.7.	QUANTIFICAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES E DE SEUS METABÓLITOS NO ESTRIADO E HIPOCAMPO.....	33
4.8.	ANÁLISE DOS NÍVEIS NIGRAIS DE BDNF	34
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6.	RESULTADOS	37
6.1.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES - TESTE DO CAMPO ABERTO.....	37
6.2.	DETERMINAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS – TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA	39
6.3.	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS NIGRAIS DE BDNF	41
6.4.	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE NEUROTRANSMISSORES, METABÓLITOS E DE SEUS TURNOVERS.....	42
6.5.	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DE NEUROTRANSMISSORES, METABÓLITOS E DE SEUS TURNOVERS	48
6.6.	CORRELAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS	54
7.	DISCUSSÃO.....	58
8.	CONCLUSÕES	65
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA GERAL DO SONO

O sono não é um estado homogêneo, mas sim um complexo fenômeno biológico. Ele inclui numerosos processos fisiológicos que estão envolvidos na transição da vigília para o sono e do sono para o despertar, sendo entendido como um estado de inconsciência reversível, caracterizado por uma diminuição da atividade e do estado de alerta (WICHNIAK A. *et al*, 2012). Enquanto existem controvérsias sobre o papel do sono como fenômeno biológico, não há dúvida que o sono, bem como a ausência dele, produz um grande impacto tanto nos aspectos fisiológicos gerais quanto nos diferentes tipos de comportamentos (GUPTA; GUPTA, 2013).

Temporalmente, o sono ocupa um terço da duração da vida humana (PENG; CHANG, 2013), sendo que os efeitos deletérios dos distúrbios do sono tem sido amplamente associados com risco aumentado para hipertensão, diabetes, obesidade, distúrbios neurocomportamentais, distúrbios do humor, doenças cardíacas e acidentes vascular cerebral (COLTON; ALTEVOGT, 2006). Tais distúrbios comprometem não só a qualidade de vida dos seres humanos como também a segurança pública, a sonolência tem sido uma das principais causas de acidentes nas estradas que levam a traumas graves, como lesão corporal, morte e perdas econômicas (SAHAYADHAS; SUNDARAJ; MURUGAPPAN, 2013). Alterações do estado vigília-sono também podem levar a erros no desempenho do trabalho profissional é a diminuição do nível crítico de vigília do trabalhador (DEMENTIENKO; DOROKHOV, 2013).

A ocorrência de distúrbios do sono é também um critério para o diagnóstico de transtornos de ansiedade e mudanças de humor (FAIRHOLME *et al*, 2013). A redução da latência para o sono dos movimentos oculares rápidos (REM) parece ter grande influência no desenvolvimento da depressão maior, porém ainda não se sabe se a alteração na latência do sono REM é um indicativo para depressão corrente ou passada (LUCCHESI *et al*, 2005).

1.2. NEUROFISIOLOGIA DO SONO E SUA ARQUITETURA

O sono é um estado fisiológico cíclico caracterizado no ser humano por cinco estágios fundamentais que se diferenciam de acordo com o padrão do eletroencefalograma (EEG) e a presença ou ausência de movimentos oculares rápidos, além de mudanças em diversas outras variáveis fisiológicas, como o tônus muscular e o padrão cardiorrespiratório (FERNANDES *et al.*, 2006).

Durante o sono, ao contrário do que já foi preconizado em muitas teorias que propunham uma redução da ativação neuronal, inúmeras regiões encefálicas encontram-se mobilizadas, sendo suas atividades claramente detectadas a partir de estudos eletrofisiológicos ou de neuroimagens (LOEW; SPIEGEL, 1976; VEIN; LEVIN, 1991). Alternando-se ritmicamente com o estado de vigília, o sono se desenrola em diversas fases consecutivas que se repetem ciclicamente. Ou seja, um ciclo completo de sono, dentro de um contexto de arquitetura normal é de cerca de 90 minutos em seres humanos e de 15 minutos em ratos (ABBOTT, 2005).

A alternância do ciclo sono-vigília é tipicamente avaliada, estagiada e quantificada, em seres humanos, por vez da polissonografia, que envolve a gravação simultânea de vários parâmetros fisiológicos, obtidos pela eletroencefalografia, eletrooculografia e a eletromiografia submentoniana ao dormir (RECHTSCHAFFEN; KALES 1968). Através desses parâmetros são detectados dois padrões fundamentais de sono: sono não REM também conhecido como sono de ondas lentas e sono com ocorrência de movimentos oculares rápidos (REM)¹. Nos seres humanos adultos o sono inicia com o sono de ondas lentas que está associado com um ritmo sincronizado no EEG onde é dividido em fases (PENG; CHANG, 2013; COLTON; ALTEVOGT, 2006; WICHNIAK A. *et al.*, 2012). A fase 1 refere-se à transição do EEG de ondas alfa com uma frequência de 8-13 Hz (prevalente na vigília) para ondas teta com uma frequência de 4-7 Hz. Esta etapa é, por vezes, referida como sonolência ou sono leve. Movimentos oculares lentos estão presentes no eletrooculograma (EOG) durante este estágio. A fase 1 deve ocupar menos do que 5% do tempo total de sono do adulto. No estágio 2 o EEG é

¹ O termo sono REM deriva do termo inglês *rapid eye movement sleep* que consagradamente é utilizado na literatura para designar essa fase do sono, será igualmente utilizado ao longo desse trabalho. Salientamos que o sono REM também pode ser chamado de sono paradoxal, devido à similaridade de seu padrão eletrofisiológico com a vigília. Portanto, padroniza-se a nomenclatura sono REM para indicar essa fase do sono em seres humanos e sono paradoxal para animais.

caracterizado por fusos variando de 11 a 16 Hz (mais comumente 12-14 Hz) e a consciência do ambiente externo desaparece. Esta fase ocupa 45-55% do sono total adultos. Fase 3 (sono profundo) é caracterizada pela presença de no mínimo 20% de ondas delta variando 0,5-2 Hz. A porcentagem de ocorrência da fase 3 é fortemente dependente da idade não deve exceder 10% do tempo total de sono em adultos e 5% em idosos com mais de 65 anos (WICHNIAK *et al*, 2012).

O intervalo de tempo entre o início do sono de ondas lentas, fase 1, e o primeiro evento de sono REM é chamado de latência para o sono REM. Observa-se que essa latência varia de 60 a 110 min, e em seguida ele ocorre normalmente em intervalos de 90 minutos sendo dominante no último terço da noite (GUPTA; GUPTA, 2013). No EEG o sono REM consiste em ondas teta de baixa frequência (5-8 Hz) que também estão presentes durante a vigília (DUSAN-PEYRETHON *et al.*, 1967; DZIRASA *et al.*, 2006; BROWN *et al*, 2012), com associação a flutuações na atividade autonômica (manifestado por mudanças no ritmo cardíaco, respiração, condutância da pele, etc), com rajadas de movimentos oculares rápidos, atonia muscular, sendo também a fase do sono associada aos sonhos, resultando em 20 a 25% do total de sono em adultos (RECHTSCHAFFEN; KALES, 1968, GUPTA; GUPTA, 2013; WICHNIAK *et al*, 2012) (Figura 1).

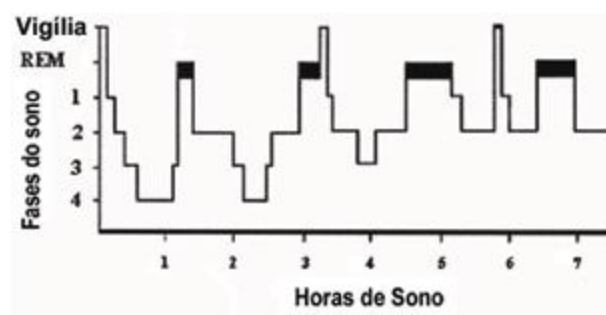


Figura 1: Representação esquemática de um hipnograma das fases do sono de ondas lentas e REM durante uma noite de sono. (Retirado de: Palma B. D., 2007).

1.3. NEUROTRANSMISSÃO DO CICLO VIGÍLIA-SONO

Durante a I Guerra Mundial, o mundo foi varrido por uma pandemia de encefalite letárgica, uma infecção encefálica viral que causou um estado de sono

profundo e prolongado na maioria dos indivíduos (SAPER; SCAMMELL, 2001). As vítimas poderiam ser despertadas brevemente quando estimuladas, mas tendiam a dormir a maior parte do tempo. Um neurologista vienense, Baron Constantin von Economo, informou que este estado de sonolência prolongada ocorreu devido a uma lesão no hipotálamo posterior e mesencéfalo rostral (SAPER; SCAMMELL, 2001). Com base nessa descoberta e em outras que descreveram os ciclos de sono (DAVIS et al. 1937) despertou-se considerável interesse pelos mecanismos neurais envolvidos na geração e manutenção desses eventos.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, como a análise de expressão gênica e animais transgênicos, grandes progressos foram conquistados no entendimento das vias neurais responsáveis pela vigília, sono de ondas lentas e sono paradoxal (LIMA et al., 2008). Vários neurotransmissores como a noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT), dopamina (DA) e neuropeptídeos como a orexina/hipocretina foram devidamente alocados dentro da circuitaria de regulação do sono (LIMA et al., 2007a; LIMA et al., 2008b; LIMA et al., 2008a; LIMA et al., 2009).

Além disso, constata-se que os eventos de sincronização e dessincronização das ondas do EEG ocorrem em consequência da atividade neuronal nos circuitos tálamo-corticais (núcleos reticulares do tálamo e córtex cerebral, decorrente da interação entre os núcleos monoaminérgicos e colinérgicos do tronco encefálico (PACE-SCHOTT; HOBSON, 2002; SAPER; SCAMMELL, 2001). Nesse contexto, o sistema ativador reticular ascendente tem papel de destaque nas alterações de sincronização cortical, sendo constituído pelos neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe, pelo locus ceruleus (LC) noradrenérgicos do tronco cerebral e pelo núcleo tuberomamilar (TMN) histaminérgico do hipotálamo posterior os quais se projetam difusamente para o tálamo e córtex cerebral. (COCK; ARNULF, 2008) (Figura 2)

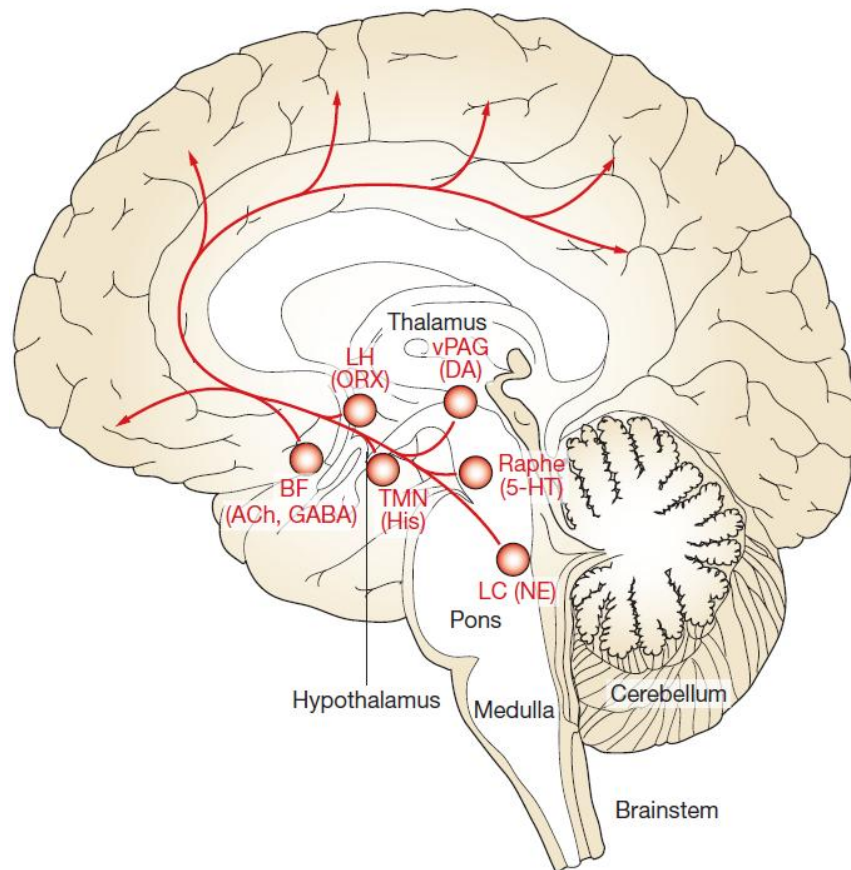


Figura 2: Componentes chave do sistema ativador reticular ascendentes. Abreviaturas: noradrenalina (NE); serotonina (5HT); histamina (His); acetilcolina (ACh); ácido gama-amino-butírico (GABA); dopamina DA; orexina (ORX); locus coeruleus (LC); núcleo túbero-mamilar (TMN); prosencéfalo basal (BF); hipotálamo lateral (LH); substância cinzenta periaquedutal ventral (vPAG). (Retirado de: De Cock and Arnulf, 2008).

Os sistemas subcorticais e seus neurotransmissores citados acima são essenciais para geração do ciclo vigília-sono e para regulação da transição entre os estágios de sono (ESPAÑA; SCAMMELL, 2011). O Prosencéfalo basal (BF) no tronco cerebral contém grandes grupos de neurônios colinérgicos que são ativados durante a vigília e o sono REM (BROWN et al, 2012; DATTA; MACLEAN, 2007). Um segundo grupo importante de neurônios colinérgicos é encontrado na ponte no núcleo pedunculopontino e dorsolateral. Como a maioria dos neurônios do BF os neurônios colinérgicos das regiões pontinas citadas acima estão principalmente ativos durante a vigília e o sono REM promovendo a ativação cortical, liberando Ach no Talamo (BROWN et al, 2012; DATTA; MACLEAN, 2007)

Outro neurotransmissor presente no ciclo vigília sono é a NA. A principal fonte deste neurotransmissor para o prosencéfalo é o locus coeruleus, onde a atividade de seus neurônios está mais acentuada durante a vigília, sendo muito menos ativos durante o sono de movimentos não rápidos dos olhos (NREM), e quase silenciosa durante o sono REM. Ainda em relação ao estado de vigília o neurotransmissor His desempenha um papel crucial. Semelhante ao padrão observado no LC e outros núcleos monoaminérgicos, taxas de disparo no TMN e liberação de His são mais elevadas durante o estado de vigília, menor durante o sono NREM e mais baixa durante o sono REM (ESPAÑA; SCAMMELL, 2011; DATTA; MACLEAN, 2007)

A 5-HT também envolvida no ciclo vigília-sono é produzida pelo núcleo dorsal da rafe e outros núcleos da rafe espalhados ao longo da linha média do tronco cerebral e juntos estes podem influenciar a área pré-óptica, prosencéfalo basal no hipotálamo e tálamo. Existem várias fontes de 5-HT e pelo menos 15 receptores diferentes para ela, com efeitos variados, incluindo o humor, aspectos do comportamento, ansiedade e agressividade (BROWN et al, 2012). Portas *et al*, (1998) evidencaram a 5-HT em maior quantidade a nível extracelular no núcleo da rafe durante a vigília.

Dentro desta circuitaria neuronal e seus neurotransmissores envolvidos na regulação do ciclo sono-vigília, a atividade dos neurônios dopaminérgicos vem sendo a mais controversa em relação a seu papel neurofisiológico, haja vista que classicamente ela é associada quase que exclusivamente com a regulação da vigília (Monti 1982; Monti and Monti 2007). Entretanto, uma série de trabalhos clínicos e em modelos animais tem apresentado a dopamina (DA) como sendo um neurotransmissor de caráter dual, portanto, estando relacionado também com a regulação dos processos de sono, em particular do sono REM (Lima et al. 2008a; Lima et al. 2007a; Lima et al. 2007b; Lima et al. 2009b; Lima et al. 2008b; Santos et al. 2008)

1.4. INFLUENCIA DO SONO NA REGULAÇÃO DO HUMOR E NA DEPRESSÃO

Distúrbios do sono são um dos sintomas de depressão e está entre os critérios de diagnóstico de um episódio depressivo. Dependendo da gravidade da

depressão, os distúrbios do sono são relatados por 60 a 90% dos pacientes com transtorno depressivo maior (PENG; CHANG, 2013). A depressão maior é atualmente o quinto maior problema de saúde pública do mundo, estando entre as doenças mais incapacitantes, sendo estimado que em 2020 ela seja a segunda doença mais comum de acordo com organização mundial de saúde (OMS) (COLTON; ALTEVOGT, 2006; WICHNIAK A. *et al*, 2012) .

O sono parece apresentar uma relação bi-direcional com os transtornos depressivos, onde a ocorrência de distúrbios do sono bem como de depressão parecem agravar-se e retroalimentar-se mutuamente. A insônia crônica é um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, bem como é um fator preditivo para episódios de depressão maior (ANDERSON; BEADLEY, 2013). Além disso, o sono é fisiologicamente anormal em pessoas com risco para a depressão, as quais podem apresentar reduções de latência para o sono REM, densidade mais elevada dos movimentos oculares, inserindo a hipótese postulada por McCerley, (1982) de que os sistemas de 5-HT e NA reprimem tanto o sono REM quanto os fenômenos depressivos e a ACh promove o sono REM e depressão (LUSTBERG; REYNOLDS, 2000; ABAD; GUILLEMINAULT, 2005).

Para o diagnóstico de transtorno depressivo maior, de acordo com *Statistics Manual of Mental Disorders DMS-IV*, basta que um indivíduo apresente humor deprimido ou perda do interesse ou prazer, durante um período de duas semanas e mais quatro sintomas de uma lista de nove, sendo estes: humor deprimido, interesse ou prazer diminuídos, significativo ganho ou perda de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva, diminuição da capacidade de concentração e pensamentos recorrentes sobre morte ou ideação suicida para ter o diagnóstico de transtorno depressivo maior. (COOPER; ROBERT, 1981).

Como parte de um estudo realizado pela *National Institute of Mental Health Epidemiologic Catchment Area* onde 7.954 voluntários de uma comunidade foram questionados sobre alterações no sono e sintomas psiquiátricos, utilizando o *Diagnostic Interview Schedule*, revelou que desta amostra 10,2% queixaram-se de insônia e 3,2% de hipersonia. (FORD; KAMEROW, 1989). Ainda nesse estudo, do total dos voluntários com queixas de insônia e hipersonia 40% e 46%, respectivamente, apresentaram algum transtorno psiquiátrico quando comparados

com 16% do total de pessoas que não apresentavam queixas de alteração de sono (FORD; KAMEROW, 1989).

Portanto, sugere-se que exista uma estreita relação entre a regulação do humor e a regulação do sono, do ponto de vista neurobiológico. A importância desta relação é ainda mais enfatizada por estudos recentes de neuroimagens e terapia de privação de sono em pacientes com depressão maior (HARVEY *et al*, 2012; VOLK *et al*, 1997; CLARK *et al*, 2005). Por exemplo, a terapia de privação de sono pode servir tanto como um catalisador de atividade antidepressiva ou agir como um coadjuvante para resistência ao tratamento (WICKNIAK *et al*, 2012);

A avaliação dos padrões de sono em indivíduos deprimidos está ajudando a responder muitas perguntas. Desde a década de 1960 pesquisas utilizando a polissonografia demonstram que perturbações do sono, como a fragmentação do sono bem como alterações de sua arquitetura estão presentes em indivíduos depressivos (PALAGINI *et al*, 2012; DEW, REYNOLD; BUYSE, 1996).

Portanto, existem correntes que apoiam o envolvimento da neurotransmissão colinérgica central na regulação do humor, no sono REM e na fisiopatologia dos distúrbios afetivos, as alterações de sono na depressão parecem ser um mecanismo compensatório fisiológico na tentativa de aumentar os níveis de NA e 5-HT (PALAGINI, 2012; GOTTESMANN; GOTTESMANN, 2007).

1.4.1 PAPÉIS DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO ENCÉFALO (BDNF) NA DEPRESSÃO E NO SONO

As neurotrofinas são uma importante classe de moléculas de sinalização no encéfalo responsáveis crescimento e maturação dos neurônios, regulação da neurotransmissão e plasticidade sináptica, (LEVINE *et al*, 1998; AZUA ET AL, 2013). Dentre um grande número de fatores neurotróficos, tais como fator de crescimento nervoso, fator neurotrófico derivado da glia e fator de crescimento fibroblástico, destaca-se o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) que parece possuir um papel relevante nos distúrbios de humor e disfunção cognitiva associada (SCHNEIDER *et al*, 2011; TECHE, 2013). O BDNF parece estar expresso em níveis mais elevados durante curtos períodos de privação de sono (CIRELLI, 2013).

Paralelamente, níveis reduzidos de BDNF foram encontrados no soro e no hipocampo de indivíduos deprimidos (KAPCZINSKI *et al*, 2008; GORGULU; CALIYURT, 2009).

O BDNF também mostra uma relação com a doença de Parkinson, pois seus níveis reduzidos podem contribuir para o aparecimento da doença uma vez que a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos na substância negra parece estar relacionada aos níveis de BDNF (APPEL, 1981; HOWELLS *et al* 2000). Estudos mostram a relação entre o comportamento depressivo em modelos animais da doença de Parkinson podendo este estar relacionado à acentuada deterioração dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica (SANTIAGO *et al*, 2010; HOWELLS *et al* 2000).

Sen *et al*, (2008) realizou uma meta-análise de 11 estudos que examinaram as diferenças no conteúdo de BDNF sérico entre indivíduos deprimidos e não deprimidos que revelou fortes indícios de que os níveis de BDNF foram menores em indivíduos deprimidos do que indivíduos saudáveis. Gorgulu and Caliyurt, (2009) compararam um grupo de 22 indivíduos com depressão tratados apenas com sertralina e outro grupo contendo 19 indivíduos tratados com sertralina associada a um protocolo de privação total de sono. Os resultados mostraram uma melhora dos sintomas depressivos, através da escala de Hamilton, que foi associada a um aumento do BDNF sérico dos indivíduos tratados com sertralina juntamente com a privação de sono total, quando comparado ao grupo tratado apenas com sertralina (Figura 3).

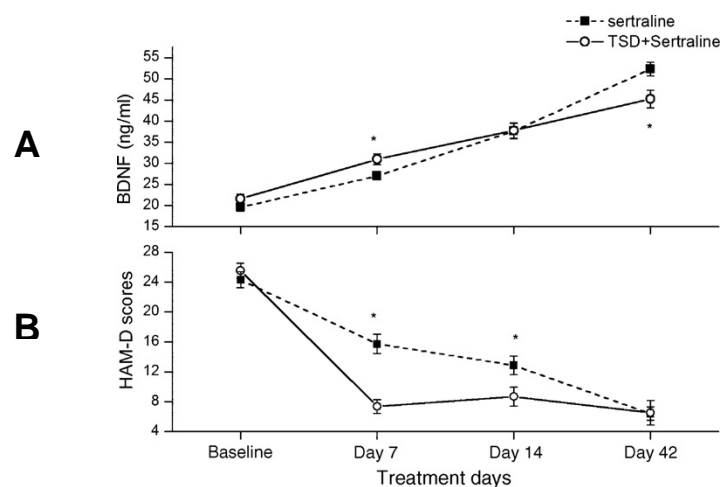


Figura 3: Efeitos anti-depressivos sinérgicos promovidos pela sertralina e privação de sono total em pacientes depressivos. **(A)** relação entre níveis séricos de BDNF

após tratamento com sertralina e após tratamento com sertralina e privação de sono total. **(B)** pontuação dos sintomas depressivos segundo a escala de Hamilton. (Retirado de Gorgulu and Caliyurt, 2009).

Assim, sugere-se que o BDNF esteja intimamente associado com a regulação do sono, bem como no desenvolvimento da depressão (DUMAN *et al.*, 1997; DUMAN *et al.*, 2000)

1.4.2 BULBECTOMIA COMO MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO

A bulbectomia olfatória vem sendo amplamente utilizada como modelo experimental para depressão, onde a destruição bilateral dos bulbos olfatórios causa alterações complexas em diferentes variáveis comportamentais, bioquímicas e celulares, muitas das quais são compatíveis com aquelas encontradas em indivíduos deprimidos (RINWA *et al.*, 2013, HENDRIKSEN *et al.*, 2012; DEUSSING, 2006). Como o bulbo olfatório possui extensas conexões eferentes com regiões mesocorticais e subcorticais, é previsível que a bulbectomia olfatória gere um grande impacto sobre as projeções para o córtex, hipocampo, amígdala, locus coeruleus e os núcleos da rafe, promovendo prejuízos sobre as funções reguladas por essas estruturas (SONG; LEONARD, 2005). Como consequência dessa remoção, observam-se majoritariamente disfunções nos sistemas noradrenergicos, dopaminérgico e serotoninérgicas ocasionando mudanças comportamentais, identificadas tipicamente duas semanas após a realização do procedimento, como hiperatividade, déficit no aprendizado, função cognitiva e hiper-responsividade ao estresse (SATO *et al.*, 2010; HARKIN; KELLY; LEONARD, 2003; MUCIGNAT-CARETTA; BUNDÍ; CARETTA, 2006; BREUER *et al.*, 2007).

Os fatores neurotróficos como BDNF tem recebido muita atenção em modelos de depressão por serem considerados mediadores antidepressivos, (FRANCESCO *et al.*, 2000) porém ainda existem controversas em relação aos seus níveis após a cirurgia de bulbectomia olfatória como os estudos de Hendriksen *et al.*, (2012) e Luo *et al.*, (2010) que evidenciou níveis reduzidos de BDNF no hipocampo e cortex pré frontal dos ratos após a bulbectomia olfatória. Em contraste, Hellweg (2007)

evidenciou um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo e cortex de ratos bulbectomizados.

Com base nas informações sobre mudanças estruturais, neurotransmissores, mudanças comportamentais que ocorrem após a bulbectomia olfatória, é evidente que existe uma sobreposição entre as anormalidades funcionais que acontecem no rato bulbectomizado e as mudanças que têm sido relatados em paciente com depressão (SONG; LEONARD, 2005; SATO *et al*, 2010; KELLY; WRYNN; LEONARD, 1997). Portanto, a literatura aponta de maneira consistente que a bulbectomia olfatória bilateral é considerada um modelo animal de depressão (SONG; LEONARD, 2005; KELLY; WRYNN; LEONARD, 1997).

1.5. PRIVAÇÃO DE SONO COMO UMA TERAPIA ANTI-DEPRESSIVA

Além do tratamento farmacológico clássico e do tratamento eletroconvulsivante a privação de sono total pode promover uma melhora dos sintomas depressivos em 40-60% dos tratamentos, onde os efeitos antidepressivos atingem seu ápice no período da tarde após uma noite de privação de sono total (GIEDK; SCHWAÈRZLER, 2002; GORGULU; CALIYURT, 2009). Embora o mecanismo por trás desse efeito antidepressivo promovido pela privação de sono não seja compreendido, estudos evidenciam que existe um aumento do *turnover* de 5-HT no córtex frontal, hipocampo e tronco encefálico assim como aumento dos níveis de BDNF após a privação de sono em animais e em seres humanos (GORGULU; CALIYURT, 2009; KATAI *et al*, 2013; ZANTA *et al*, 2011).

A privação de sono REM promove a melhora do estado de humor observada na depressão sugerindo um envolvimento das monoaminas associadas a essa fase do sono (SALOMON *et al*, 1994). Vogel, (1980) mostrou que indivíduos depressivos sem uso de medicamentos apresentavam uma latência menor para o sono REM e um aumento na frequência do mesmo quando comparados com indivíduos saudáveis, porém após a privação do sono REM estes indivíduos apresentavam uma melhora dos sintomas depressivos e da distribuição temporal do sono REM.

Os distúrbios de sono pertencem aos sintomas centrais da depressão, tais como aumento da quantidade de sono REM e uma diminuição na latência para o

sono REM (GIEDKE; SCHWARZLER, 2002). Vogel (1975) demonstrou que a privação do sono REM, em indivíduos deprimidos hospitalizados, foi mais eficaz em gerar um efeito antidepressivo do que a privação do sono de ondas lentas. Por outro lado, inibidores seletivos da recaptção de 5-HT são comumente utilizados como antidepressivos eficazes com forte efeito de inibição de sono REM, bem como aumento da latência para o REM, supostamente pelo aumento da concentração sináptica de 5-HT através da inibição de sua recaptção (GIEDKE; SCHWARZLER, 2002; ZANT et al, 2011).

Portanto, é possível levantar a hipótese de que o efeito antidepressivo das drogas inibidoras seletivas da recaptção de serotonina seja em decorrência, pelo menos em parte, da inibição do sono REM. De maneira complementar, a privação de sono REM, bem como suas consequências neuroquímicas em estruturas como o estriado e o hipocampo, parece estar associada com mecanismos neurofisiológicos supostamente antidepressivos, tanto no que tange os neurotransmissores envolvidos, quanto os fatores neurotróficos, em particular o BDNF.

2. JUSTIFICATIVA

A privação de sono promove um efeito benéfico quando utilizada como terapêutica para indivíduos depressivos melhorando o estado de humor agudamente. Em modelos animais de depressão, realizados através de bulbectomia olfatória, efeitos antidepressivos também foram encontrados, com alteração nos níveis de 5-HT e fatores associados à plasticidade neuronal como o BDNF. Somando-se as informações contidas na literatura e os estudos já realizados em nosso laboratório sugere-se que a privação de sono paradoxal esteja intimamente envolvida com o sistema serotoninérgico e dopaminérgico e, portanto, promovendo um impacto direto sobre os parâmetros associados à depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos antidepressivos promovidos pela privação de sono paradoxal, em animais submetidos à bulbectomia olfatória, através de análises comportamentais, moleculares e neuroquímicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos comportamentais promovidos pela bulbectomia olfatória nos testes da natação forçada modificada e do campo aberto
- Analisar os possíveis efeitos antidepressivos promovidos pela privação de sono paradoxal e após o período de sono rebote
- Determinar as possíveis variações neuroquímicas de neurotransmissores (DA, 5-HT e NA) e de seus metabólitos no estriado, hipocampo e SNpc mediante bulbectomia olfatória e privação de sono paradoxal.
- Quantificar os níveis de BDNF na SNpc de animais submetidos à bulbectomia olfatória após a privação de sono paradoxal e sono rebote

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos de nossa colônia de reprodução pesando 280-320 gramas no início das experiências. Os animais foram alojados aleatoriamente em grupos de cinco em caixas de polipropileno com aparas de madeira como cama e mantidos numa sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) com um ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00). Os animais tiveram livre acesso à água e comida durante todo o experimento. Todos os experimentos foram aprovados pela CEUA-BIO-UFPR, protocolo No. 607.

4.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em caixas de polipropileno em grupos de 5 animais por caixa. Para a realização dos experimentos os animais foram randomicamente distriuídos em 6 grupos sendos estes: sham controle (n=10); OBX controle (n=10); sham PSP (n=10); OBX PSP (n=10), sham REB (n=10); OBX REB (n=10).

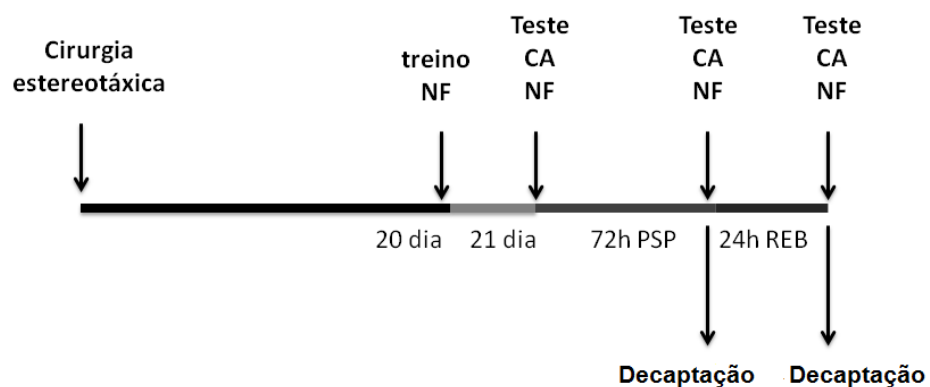


Figura 4: Desenho experimental: no 1º dia os animais realizaram a cirurgia estereotáxica, passaram por um período de recuperação e no 20º dia realizaram o

treino para o teste de natação forçada (NF). No 21º dia realizaram os teste do campo aberto (CA) e NF. Foram privados de sono paradoxal (PSP) por 72 horas, e repetiram os testes de CA e NF no 24º dia de experimento. Um grupo de animais foi sacrificado e outro passou pelo sono rebore (REB) de 24 horas os quais realizaram novamente os testes de CA e NF no 25º dia de experimento e posteriormente decaptados.

4.3. BULBECTOMIA OLFATÓRIA

Os animais foram submetidos a bulbectomia olfatória através de cirurgia estereotáxica onde os animais foram previamente anestesiados com xilazina (0,5 mL, im; Syntec do Brasil Ltda) e quetamina (0,5 mL, im; Syntec do Brasil Ltda).

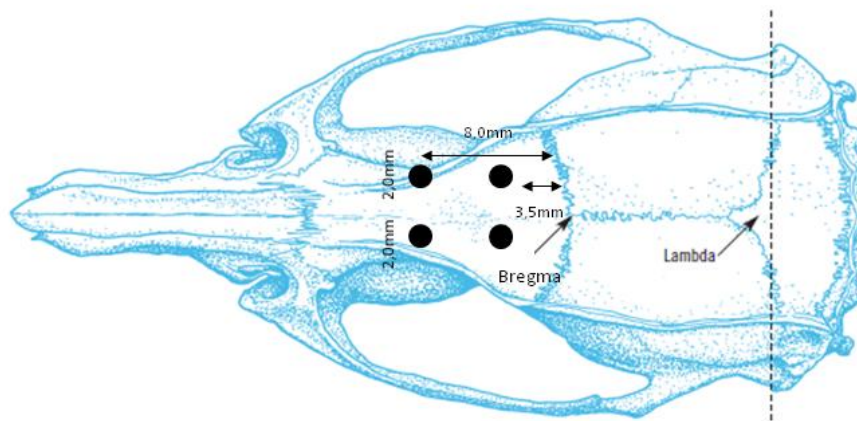


Figura 5: A cirurgia foi realizada através de incisão mediana de 2 cm na orientação rostro-caudal, sendo que na sequência foram perfurados dois orifícios a 8 mm na orientação crânio-rostral a partir do bregma e 2 mm lateral da linha média. Posteriormente à sutura sagital fez-se outro orifício a 3,5 mm a partir do bregma e 2 milímetros lateral da linha média, com o objetivo de abrir uma janela no crânio dos ratos para acessar os bulbos olfatórios (CAIRNCROSS; COX *et al*, 1978, PAXINOS G.; WATSON C., 1972)

O bulbo olfatório foi removido bilateralmente por meio de aspiração, utilizando-se para isso uma bomba a vácuo conectada à cânula ligada à uma

ponteira plástica. Após esse procedimento os animais tiveram a pele do crânio suturada. Os animais dos grupos sham passaram pela mesma rotina cirúrgica, à exceção da aspiração do bulbo olfatório. Todos os animais foram colocados sob uma lâmpada de calor até a recuperação, mantidos isolados por 2 dias, e depois voltaram para suas gaiolas moradia. O critério de exclusão dos animais que passaram por esse procedimento cirúrgico foi quando observou-se qualquer tipo de dano morfológico ao córtex frontal.

4.4. TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA

Após 20 dias da cirurgia estereotáxia os ratos foram colocados num cilindro de plástico opaco (20 cm de diâmetro, altura de 50 cm) contendo água até 30 cm (24 ± 1 °C), onde permaneceram durante 15 min (treino) e 24 horas mais tarde, eles foram testados durante 5 min (sessão de teste). A sessão de teste foi gravada através de uma câmara posicionada por cima do cilindro para a análise subsequente. Os comportamentos registrados durante a sessão de teste foram: imobilidade (quando o rato parou todos os comportamentos ativos e manteve-se flutuando na água com movimentos mínimos, com a cabeça acima da água), natação (movimentos de natação por todo o cilindro, incluindo a passagem para outro quadrante) e escalada (movimentos para cima com patas dianteiras direcionadas ao longo das paredes do cilindro). O tempo em cada parametro foi marcado ao longo dos 300 segundos de filmagem para cada animal. A água foi mudada e o cilindro lavado com água limpa depois de cada rato. Após as sessões de teste, os animais foram secos e colocados nas suas gaiolas moradia. (PORSOLT: LE PICHON; JALFRE, 1977; DETKE: RICKELS: LUCKI, 1995).

4.5. TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste é realizado em uma arena circular de 1 metro de diâmetro, limitada por uma parede de 40 cm de altura sendo iluminado por quatro lampadas de 60 W situados a 48 cm acima do chão da arena, fornecendo a iluminação de cerca de 300

lux (BROADHURST, 1960). Os animais foram colocados delicadamente no centro da arena e ficaram livres para explorar livremente a arena durante 5 minutos. Durante os experimentos o campo aberto foi gravado por vídeo e as medidas de distância total percorrida e de velocidade foram calculadas por um sistema de análise de imagens (Smart Júnior, Panlab Harvard Apparatus, Espanha).

4.6. PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL

Esse método foi realizado por meio da plataforma única em que cada um dos animais a serem privados de sono foi colocado sobre uma plataforma cilíndrica com 6,5 cm de diâmetro rodeada por água cerca de 1 cm abaixo da superfície da plataforma (LIMA *et al*, 2008b). No início de cada episódio de sono paradoxal o animal sofre perda de tônus muscular e cai na água sendo assim despertado. Com este método o sono paradoxal é completamente inibido (Machado *et al*, 2004). Ao longo do estudo o local do experimento foi mantido em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 h onde as luzes foram acessas as 07:00am. Os grupos controle foram mantidos nas mesmas condições, porém em vez de água, as gaiolas de privação continham cepilho. Tanto o grupo experimental quanto no grupo controle foram privados do sono paradoxal por 72h. Comida e água foram fornecidas sem restrições durante todo o experimento.

4.7. QUANTIFICAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES E DE SEUS METABÓLITOS NO ESTRIADO E HIPOCAMPO

O corpo estriado, hipocampo e substância negra dos ratos foram rapidamente dissecados e armazenados a -80°C até as quantificações neuroquímicas. As concentrações endógenas de DA, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), a serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5 HIAA), noradrenalina (NA) e dihydroxyphenylglycol (DHPG) foram ensaiados por cromatografia de fase reversa de elevado desempenho líquida (HPLC) com detecção electroquímica. Resumidamente, o sistema consiste numa coluna de fase

inversa Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4,6 mm ID, 4 μ m de tamanho de partícula), equipado com um 4 x 3,0 milímetros pré-coluna (agente de segurança cartuchos Fusion-RP); um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector), equipado com uma célula de guarda (ESA 5020) com o eletrodo fixado em 350 mV e um eletrodo de célula analítica dupla (ESA 5011A); uma bomba LC-20AT (Shimadzu), equipado com um Manual Rheodyne 7725 equipado com injetor 20 μ L. A coluna foi mantida no interior de um forno com temperatura controlada (25° C). A célula continha duas câmaras em série: cada câmara, incluindo um eletrodo de grafite poroso coulométrico, um contra-eletrodo de casal e um eletrodo de dupla referência. Potenciais oxidantes foram fixados em 100 mV para o primeiro eletrodo e em 450 mV para o segundo eletrodo. As amostras de tecido foram homogeneizadas com um disruptor de célula ultra-sônico (Sonics) em 0,1 M de ácido perclórico, contendo metabissulfito de sódio 0,02% e um padrão interno. Após a centrifugação a 10.000 xg durante 30 min a 4 ° C, 20 μ L do sobrenadante foram injectados no cromatógrafo. A fase móvel, usada a uma taxa de fluxo de 1 mL / min, tinha a seguinte composição: 20 g de ácido cítrico mono-hidratado (Merck), 200 mg de sal de sódio do ácido octano-1-sulfónico (Merck), 40 mg de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma), 900 mL de água de grau HPLC. O pH da solução tampão de corrida foi ajustado para 4,0, em seguida, filtrada através de um filtro de 0,45 μ m. Metanol (Merck) foi adicionado para dar uma composição final de 10% de metanol (v / v). Os neurotransmissores e as concentrações de metabólitos foram calculados utilizando-se curvas padrão que foram gerados por meio da determinação em triplicado as razões entre três diferentes quantidades conhecidas de padrão interno. as concentrações foram expressas como ng/g de peso úmido de tecido.

4.8. ANÁLISE DOS NÍVEIS NIGRAIS DE BDNF

Os animais dos grupos experimentais foram decapitados e a substancia negra foi rapidamente dissecada, colocada em gelo seco e armazenadas a -80° C. Antes das análises, a homogeneização do tecido inicial (1:10 w/v) com tampão de lise

contendo Tris 100 mM-HCl (pH 7,2), 400 mM de NaCl, 4 mM de ácido etilenodiaminotetracético, azida de sódio a 0,05%, 0,5% de gelatina, 0,2% de Triton X-100, 2% de BSA, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de N-etil-maleimida e 2,5 mM de fenantrolina foi realizada por impulsos de sonicação curta durante 15 s. Após 40 min em gelo, os homogenatos foram centrifugados (11.000 xg, 20 min, 4 ° C) e o sobrenadante foi recolhido. Diferentes diluições (1:12) dos os extractos da substancia negra foram utilizados para a análise da concentração de BDNF (ELFVING; PLOUGMANN; WEGENER, 2010), que foi mensurado usutilizando o Sistema de Imunoensaio Promega Emax (Promega Co., Madison, WY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de poliestileno com 96 poços foram revestidas com anticorpo monoclonal anti-BDNF (Acm) em tampão de carbonato de pH 9,2 durante a noite a 4 ° C. MAbs não adsorvido foram lavadas com fosfato salino tampão contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e as placas foram bloqueadas com Promega Block e tampão de amostra durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, 100 ul de cada amostra foram adicionados em triplicado e as placas foram incubadas durante 2h à temperatura ambiente. Após lavagem extensiva com PBST, o anticorpo policlonal de BDNF anti-humano (PABs) foi incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, PABs não ligados foram removidos por lavagem com o conjugado de peroxidase de rábano PBST e anti-IgY foi adicionado durante 1 hora à temperatura ambiente. A reacção foi desenvolvida utilizando uma solução TMB e parou com 1 M de HCl. A absorvância foi medida a 450 nm.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de análise de variâncias (ANOVA) de duas vias, utilizando os fatores privação de sono paradoxal (PSP) e bulbectomia (OBX), seguido de *post hoc* de Bonferroni. Correlações de Pearson foram realizadas entre os diferentes parâmetros comportamentais, obtidos no teste da natação forçada, e parâmetros neuroquímicos como os níveis estriatais e hipocampais de 5-HT, DA e NA, assim como com as concentrações nigrais de

BDNF. Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M), sendo que o nível de significância foi estabelecido como $P \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES - TESTE DO CAMPO ABERTO

Como pode ser visto na Fig. 6A o grupo OBX controle demonstrou um aumento significativo da distância percorrida em comparação ao grupo sham controle ($P < 0,01$), OBX PSD ($P < 0,01$) e OBX REB ($P < 0,01$). ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos para o fator PSP [$F(2,42) = 4,62, P = 0,015$] e interação [$F(2,42) = 3,73, P = 0,032$], mas não para o fator OBX [$F(1,42) = 3,07; P = 0,087$]. Analogamente, efeitos significativos foram encontradas para o parâmetro de velocidade média (Fig. 6B) em relação ao grupo OBX controle quando comparado com os grupos sham controle ($P < 0,01$), OBX PSP ($P < 0,01$) e OBX REB ($P < 0,01$), como indicado pelo fatores PSP [$F(2,42) = 4,54, P = 0,016$], OBX [$F(1,42) = 3,48, P = 0,07$] bem como pela interação de ambos [$F(2,42) = 4,11, p = 0,02$].

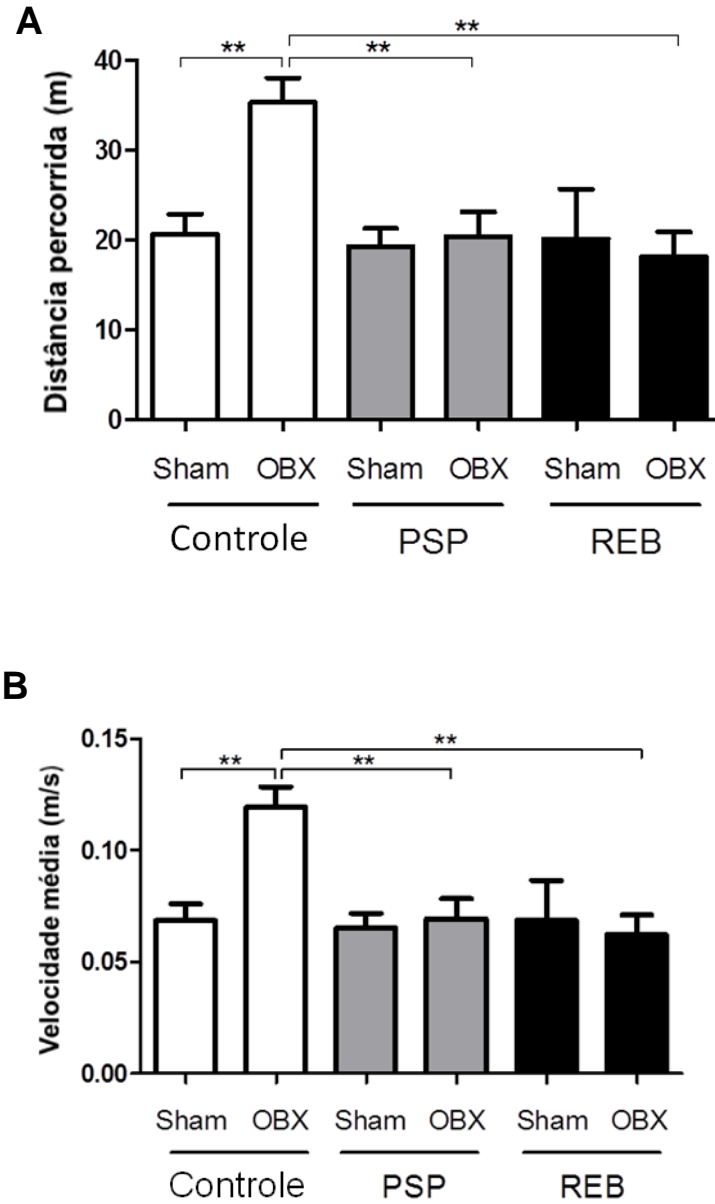


Figura 6: Avaliação dos parâmetros motores pelo teste do campo aberto. **(A)** distância percorrida; **(B)** velocidade média. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. $**P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

6.2. DETERMINAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS TIPO DEPRESSIVOS – TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADA

Em relação ao parâmetro de natação (Fig. 7A), o grupo OBX controle demonstrou uma redução significativa deste tempo em relação aos grupos sham controle ($P < 0,05$), sham PSP ($P < 0,05$), OBX PSP ($P < 0,001$) e OBX REB ($P < 0,001$), como revelado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 12,22, P = 0,0002$], OBX [$F(1,36) = 0,15, P = 0,7$] e pela interação destes [$F(2,36) = 10,73, P = 0,0005$]. Além disso, a análise do parâmetro escalada (Fig. 7B) mostrou que este comportamento está aumentado no grupo OBX controle em comparação com os grupos sham PSP ($P < 0,01$) e OBX PSP ($P < 0,01$). Ainda, o grupo OBX REB também apresentou um aumento no tempo de escalada em comparação com o grupo OBX PSP ($P < 0,01$), como demonstrado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 11,74, P = 0,0002$], OBX [$F(1,36) = 5,08; P = 0,031$] e pela interação destes [$F(2,36) = 1,37, P = 0,27$].

Complementarmente, a análise do parâmetro de imobilidade (Fig. 7C), revelou que o grupo OBX controle apresentou um aumento significativo deste tempo em comparação com o grupo sham controle ($P < 0,05$). No entanto, o grupo OBX PSP exibiu uma diminuição no tempo de imobilidade, em comparação com os grupos sham PSP ($P < 0,05$) e OBX controle ($P < 0,05$) como indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 0,13, P = 0,87$], OBX [$F(1,36) = 0,92, P = 0,34$] e pela interação destes [$F(2,36) = 13,13, P = 0,0001$].

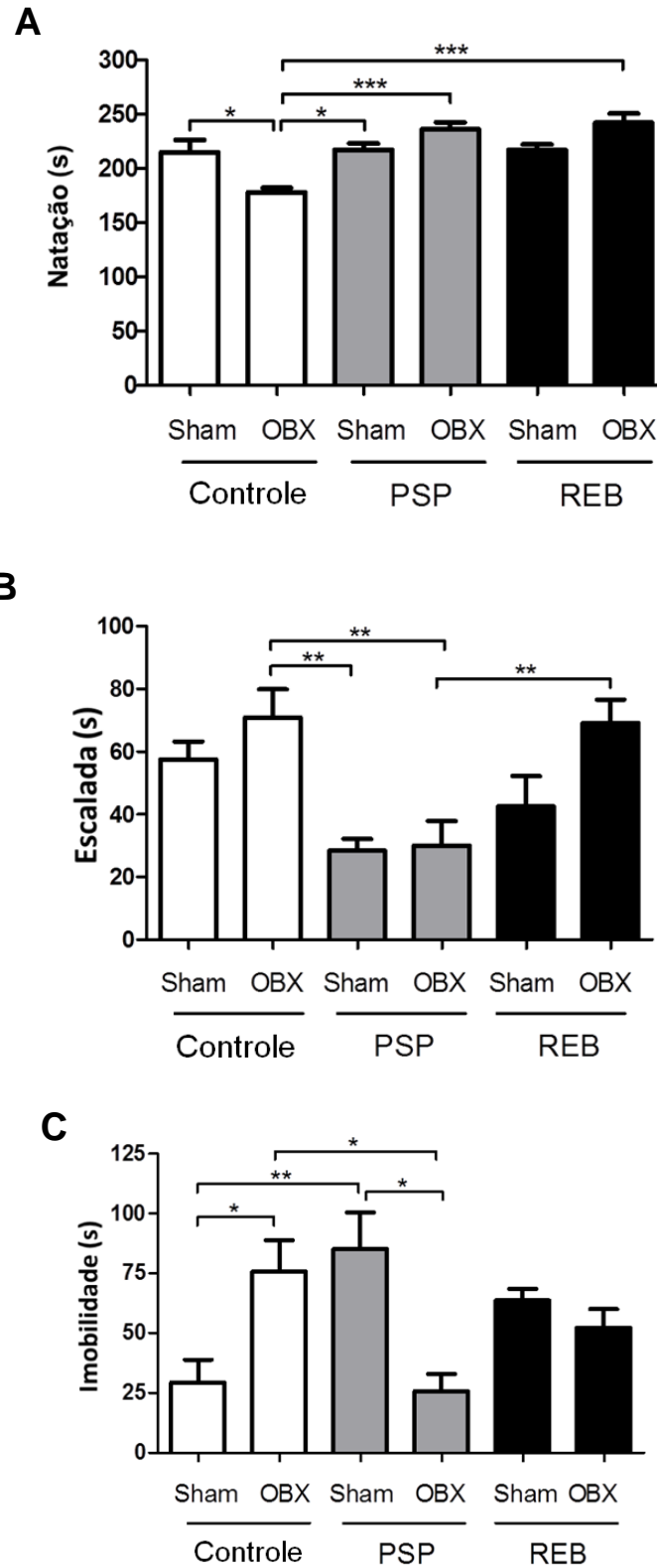


Figura 7: Avaliação dos parâmetros do teste da natação forçada modificada (**A**) natação; (**B**) escalada e (**C**) imobilidade. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

6.3. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS NIGRAIS DE BDNF

A análise dos níveis de BDNF na SNpc (Fig. 8) mostraram que o grupo OBX controle apresentou uma diminuição da expressão deste fator neurotrófico em comparação com o grupo sham controle ($P < 0,05$). No entanto, os grupos OBX PSP ($P < 0,01$) e REB OBX ($P < 0,05$), revelaram aumentos significativos nos seus respectivos conteúdos de BDNF em comparação com o grupo OBX controle, como demonstrado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 5,8$, $p = 0,007$], OBX [$F(1,36) = 22,05$, $P < 0,0001$] e pela interação destes [$F(2,36) = 0,39$, $P = 0,68$].

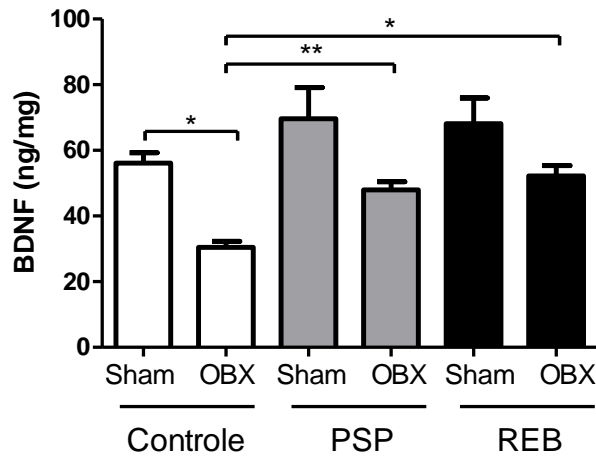


Figura 8: Avaliação dos níveis nigrais de BDNF. Os valores foram expressos como media \pm S.E.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

6.4. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS ESTRIATAIS DE NEUROTRANSMISSORES, METABÓLITOS E DE SEUS TURNOVERS

A Fig. 9 ilustra as alterações neuroquímicas identificadas no estriado. Observou-se que os níveis de DA (Fig. 9A) foram intensamente aumentados no grupo sham REB em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,001$), sham PSP ($P < 0,01$) e OBX REB ($P < 0,01$), como demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 10,6, $P = 0,003$], OBX [F (1,36) = 6,9, $P = 0,013$] e pela interação destes [F (2,36) = 4,02, $P = 0,03$]. Além disso, considerando os níveis de DOPAC (Fig. 9B), o grupo sham PSP mostrou um incremento deste metabólito em relação ao grupo sham controle ($P < 0,001$), OBX PSD ($P < 0,001$) e sham REB ($P < 0,001$), como demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 6,03, $P = 0,006$], OBX [F (1,36) = 1,16, $P = 0,29$] e interação [F (2,36) = 15,23, $P < 0,0001$]. Em paralelo, os níveis de HVA (dados não mostrados) foram intensamente aumentados no grupo sham PSP em comparação ao grupo sham controle ($P < 0,01$) e sham REB ($P < 0,01$), como demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 12,32, $P = 0,0001$], OBX [F (1,36) = 0,04, $P = 0,84$] e sua interação [F (2,36) = 3,36, $P = 0,04$]. Por consequência, o cálculo do *turnover* estriatal de DA (Fig. 9C), revelou que o grupo sham PSP mostrou um aumento significativo desse parâmetro em comparação com o grupo sham REB ($P < 0,01$). Além disso, o grupo OBX REB também apresentou um aumento no *turnover* de DA, em comparação com o grupo sham REB ($P < 0,05$), como demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 5,06, $P = 0,01$], OBX [F (1,36) = 0,51, $P = 0,5$] e interação [F (2,36) = 4,7, $P = 0,017$].

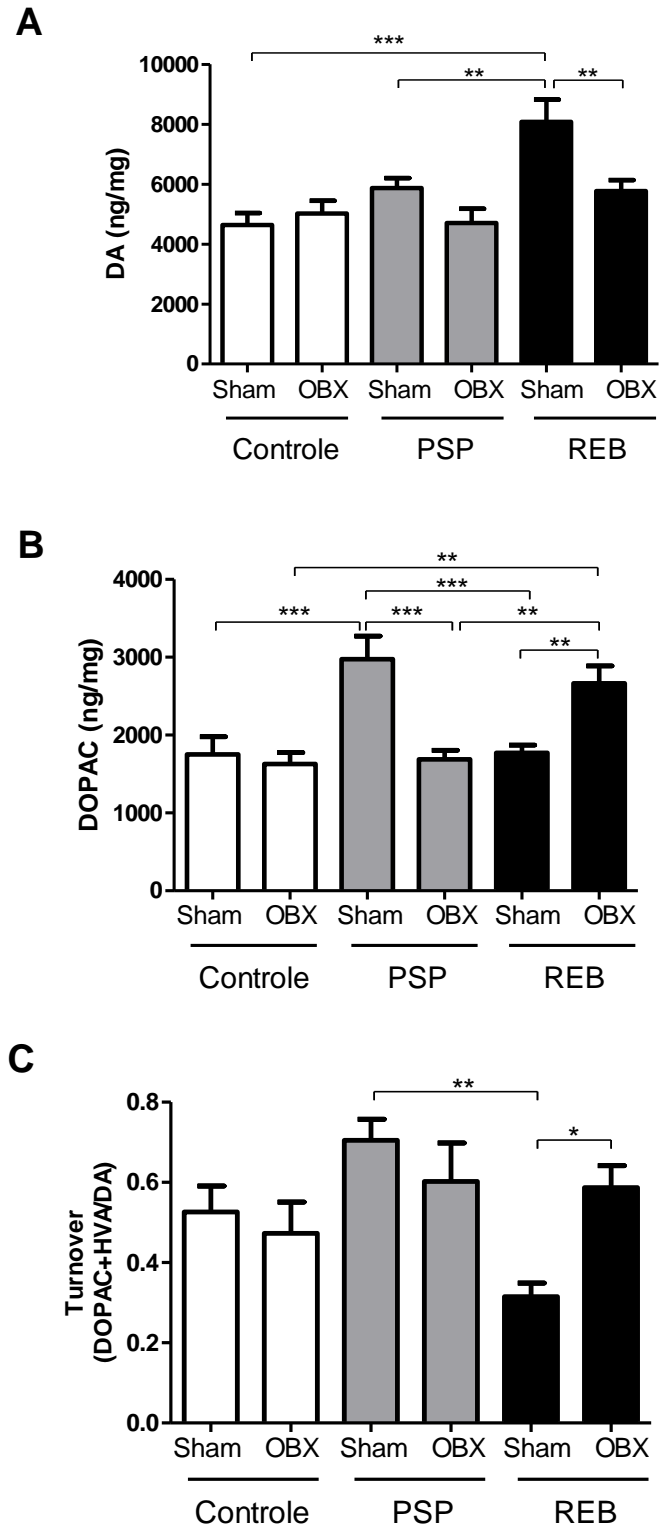


Figura 9: Quantificação dos níveis estriatais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. **(A)** níveis de dopamine (DA); **(B)** níveis do metabólito (DOPAC) e **(C)** *Turnover* (DOPAC e HVA/DA) . Os valores foram expressos como media \pm S.E.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

No que diz respeito aos níveis de 5-HT detectados no estriado (Fig. 10D), o grupo sham REB apresentou incrementos deste neurotransmissor, quando comparado com os grupos sham controle ($P < 0,001$), sham PSP ($P < 0,001$) e OBX REB ($P < 0,001$), conforme indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 16,43$, $P < 0,0001$], OBX [$F(1,36) = 24,9$, $P < 0,0001$] e interação destes [$F(2,36) = 3,86$, $P = 0,04$]. Além disso, o metabolito 5-HIAA (Fig. 10E) apresentou um aumento significativo no grupo de sham PSP em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,001$), OBX PSP ($P < 0,05$) e sham REB ($P < 0,05$) como demonstrado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 9,64$, $P = 0,0008$], OBX [$F(1,36) = 4,34$, $P = 0,05$] e interação [$F(2,36) = 1,76$, $P = 0,19$]. Como resultado, o *turnover* estriatal de 5-HT (Fig. 10F) mostrou um aumento significativo no grupo no sham PSP comparado ao grupo sham controle ($P < 0,05$). Além disso, o grupo OBX PSP também apresentou um aumento no turnover de 5-HT estriatal em comparação com o grupo OBX REB ($P < 0,01$), como representado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 20,38$, $P < 0,0001$], OBX [$F(1,36) = 7,13$; $P = 0,013$] e sua interação [$F(2,36) = 0,57$, $P = 0,57$].

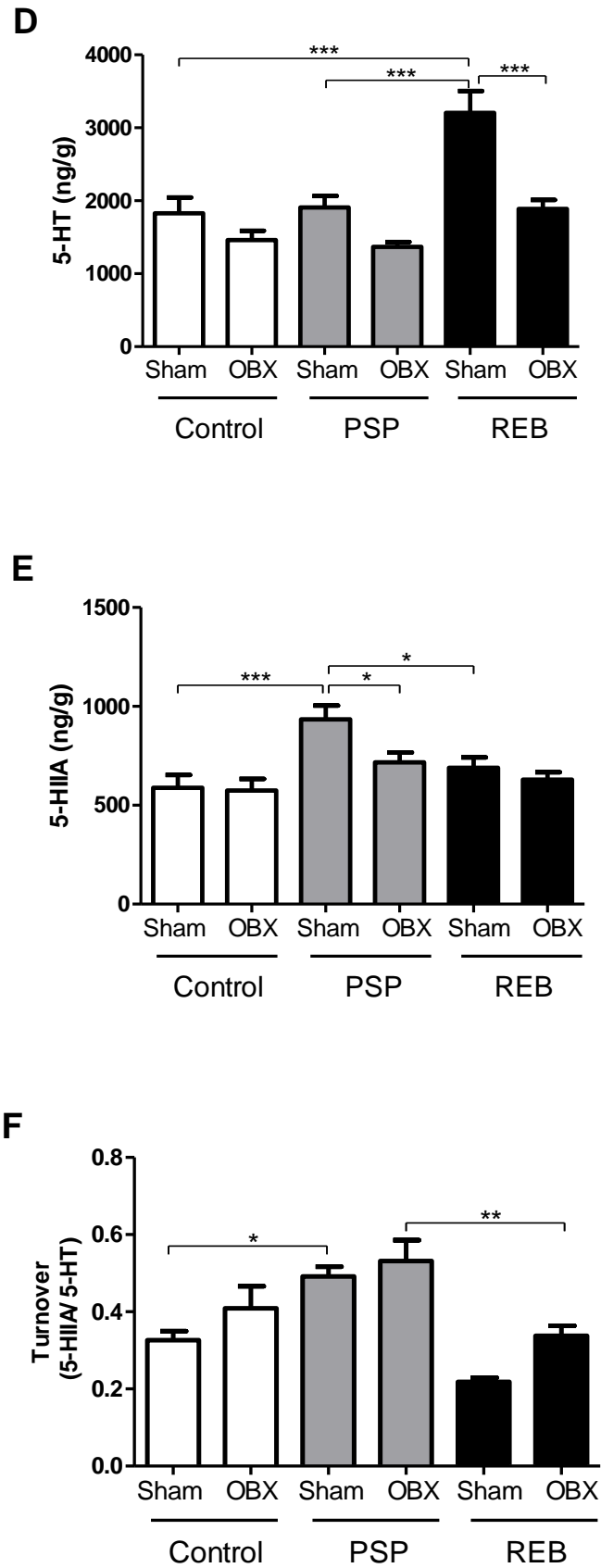


Figura 10: Quantificação dos níveis estriatais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. (D) níveis de serotonina(5-HT); (E) níveis do metabólito (5-HIAA) e

(F) *Turnover* (5-HIA e 5HT). Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

Em relação às variações nos níveis estriatais de NA, a Fig. 11G indica que o grupo sham PSP manifestou aumento nesse parâmetro em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,01$) e OBX PSP ($P < 0,01$). De forma semelhante, o grupo sham REB apresentou um aumento significativo quando comparado com o grupo sham controle ($P < 0,01$), bem como o grupo OBX REB também apresentou um aumento na concentração de NA quando comparado aos grupos OBX PSP ($P < 0,001$) e OBX controle ($P < 0,001$), conforme demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 20,33, $P < 0,0001$], OBX [F (1,36) = 0,76, $P = 0,4$] e sua interação [F (2,36) = 6,6, $P = 0,005$]. No entanto, a Fig. 11H mostra a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos, considerando-se os níveis de DHPG, como revelado pelos fatores PSP [F (2,36) = 0,47, $P = 0,63$], OBX [F (1,36) = 0,36, $P = 0,55$] e interação [F (2,36) = 0,17, $P = 0,84$]. Em relação ao turnover estriatal de NA (Fig. 11I), o grupo sham PSP apresentou um aumento significativo comparado aos grupos sham controle ($P < 0,05$) e OBX PSP ($P < 0,05$). De fato, o grupo sham REB manifestou uma redução deste parâmetro em relação ao sham controle ($P < 0,05$). Além disso, o grupo OBX REB exibiu uma diminuição quando comparado com os grupos OBX controle ($P < 0,05$) e OBX PSP ($P < 0,05$), como indicado pelos fatores PSP [F (2,36) = 11,48, $P = 0,0003$], OBX [F (1,36) = 2,48, $P = 0,13$] e interação [F (2,36) = 3,34, $P = 0,05$].

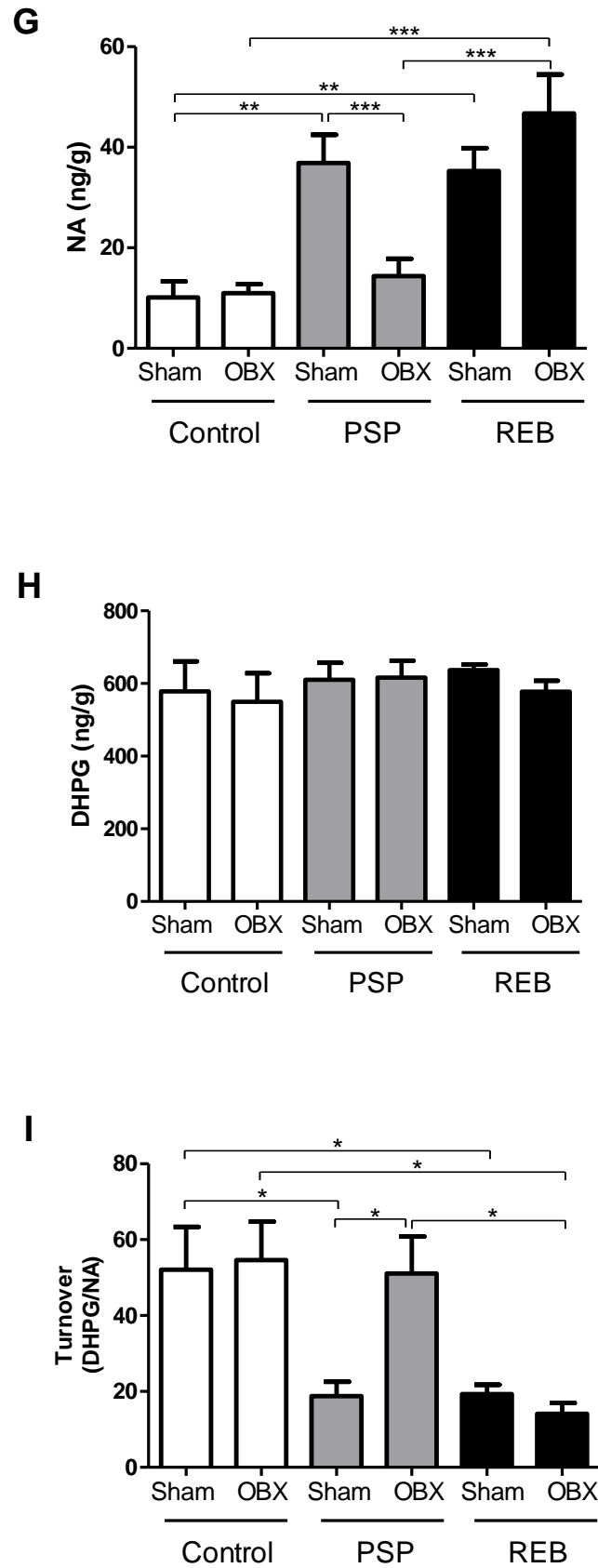


Figura 11: Quantificação dos níveis estriatais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. (**G**) níveis de noradrenalina (NA); (**H**) níveis do metabólito (5-

DHPG/NA) e (I) *Turnover* (5-HIAA e 5HT). Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

6.5. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS HIPOCAMPAIS DE NEUROTRANSMISSORES, METABÓLITOS E DE SEUS TURNOVERS

A Fig. 12 mostra as alterações neuroquímicas identificadas no hipocampo. Os níveis de DA (Fig. 12A) mostraram-se reduzidos no grupo de sham PSP em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,05$) e OBX PSD ($P < 0,05$), como indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 4,43$; $P = 0,02$], OBX [$F(1,36) = 10,86$, $P = 0,003$] e sua interação [$F(2,36) = 2,58$, $p = 0,09$]. Já, o conteúdo de DOPAC hipocampal (Fig. 12B) apresentou-se aumentando para o grupo sham PSP em relação aos grupos OBX PSP ($P < 0,05$) e sham REB ($P < 0,001$). Entretanto, o grupo sham REB apresentou um decréscimo nos níveis de DOPAC quando comparado ao grupo sham PSP ($P < 0,001$), conforme indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 14,26$, $P < 0,0001$], OBX [$F(1,36) = 4,7$, $P = 0,04$] e interação destes [$F(2,36) = 1,57$, $p = 0,23$]. Em adição, a quantificação do metabólito HVA (dados não mostrados) indicou a ausência de diferenças significativas entre os grupos, tal como evidenciado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 0,34$, $P = 0,72$], OBX [$F(1,36) = 0,22$, $P = 0,65$] e interação [$F(2,36) = 0,93$, $P = 0,41$]. De maneira complementar, o cálculo do turnover hipocampal de DA (Fig. 12C) indicou um aumento desse parâmetro no grupo sham PSP quando comparado com o grupo OBX PSP ($P < 0,05$), de acordo com os fatores PSP [$F(2,36) = 2,35$, $P = 0,12$], OBX [$F(1,36) = 5,08$, $P = 0,033$] e sua interação [$F(2,36) = 0,72$, $P = 0,5$].

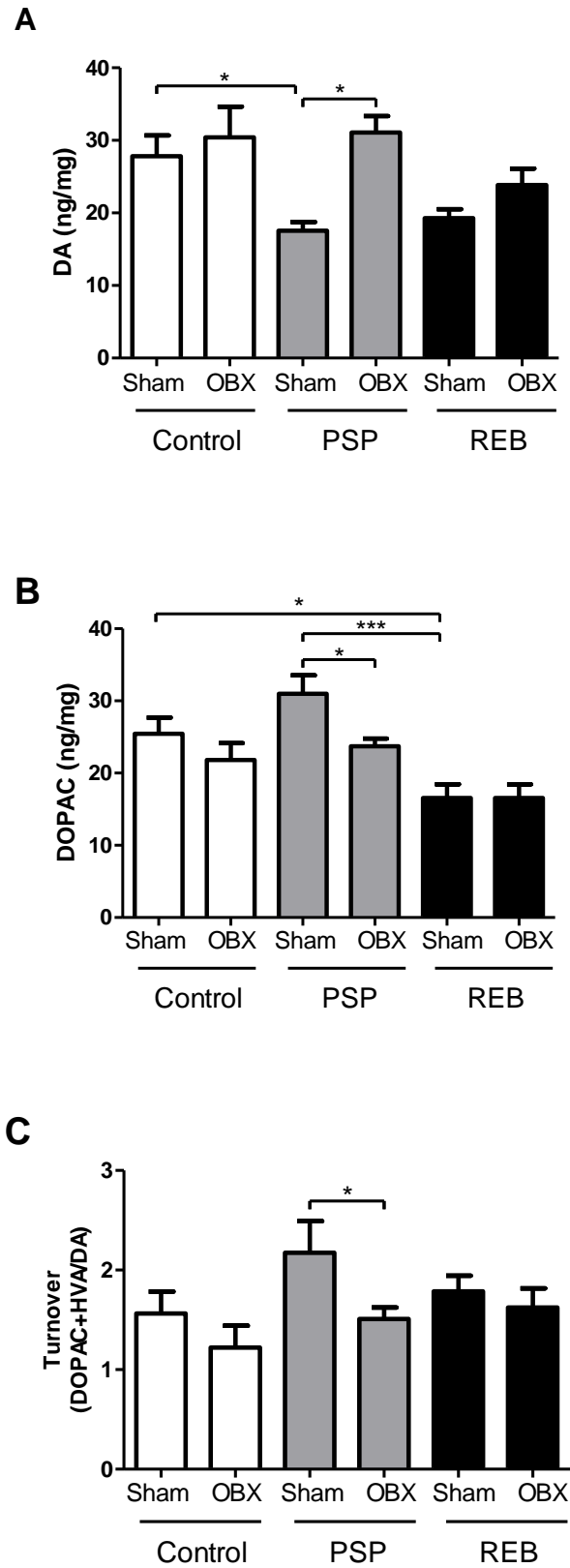


Figura 12: Quantificação dos níveis hipocâmpais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. **(A)** níveis de dopamina (DA); **(B)** níveis do metabólito (DOPAC) e **(C)** *Turnover* (DOPAC + HVA/DA). Os valores foram

expressos como media \pm S.E.M. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

Considerando os níveis hipocâmpais de 5-HT (Fig. 13D), o grupo controle OBX revelou uma diminuição significativa neste neurotransmissor em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,05$), sham PSP ($P < 0,05$), OBX PSP ($P < 0,05$), sham REB ($P < 0,01$) e OBX REB ($P < 0,001$). Além disso, o grupo REB OBX demonstrou um aumento significativo de 5-HT quando comparado com o grupo OBX PSP ($P < 0,05$), como indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 12,43$, $P = 0,0002$], OBX [$F(1,36) = 2,55$; $P = 0,12$] e interação destes [$F(2,36) = 4,37$, $P = 0,02$]. No que diz respeito ao metabolito 5-HIAA (Fig. 13E), verificou-se estar aumentado este parâmetro no sham PSP em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,05$) e sham REB ($P < 0,05$), de acordo com os fatores PSP [$F(2,36) = 8,86$, $P = 0,001$], OBX [$F(1,36) = 2,87$, $P = 0,1$] e interação [$F(2,36) = 2,1$, $P = 0,14$].

Além disso, a análise do *turnover* hipocâmpal de 5-HT indica que o grupo OBX controle manifestou um aumento neste parâmetro em relação aos grupos sham controle ($P < 0,001$) e OBX REB ($P < 0,001$). Do mesmo modo, o grupo sham PSP também apresentou um aumento no turnover da 5-HT hipocâmpal em comparação com os grupos sham controle ($P < 0,05$) e o sham REB ($P < 0,05$). Além disso, o grupo PSP OBX demonstrou um aumento neste parâmetro, quando comparado com o grupo OBX REB ($P < 0,05$), como indicado pelos fatores PSP [$F(2,36) = 12,1$, $P = 0,0002$], OBX [$F(1,36) = 8,7$; $P = 0,007$] e interação [$F(2,36) = 5,98$, $P = 0,008$] (Fig. 13F).

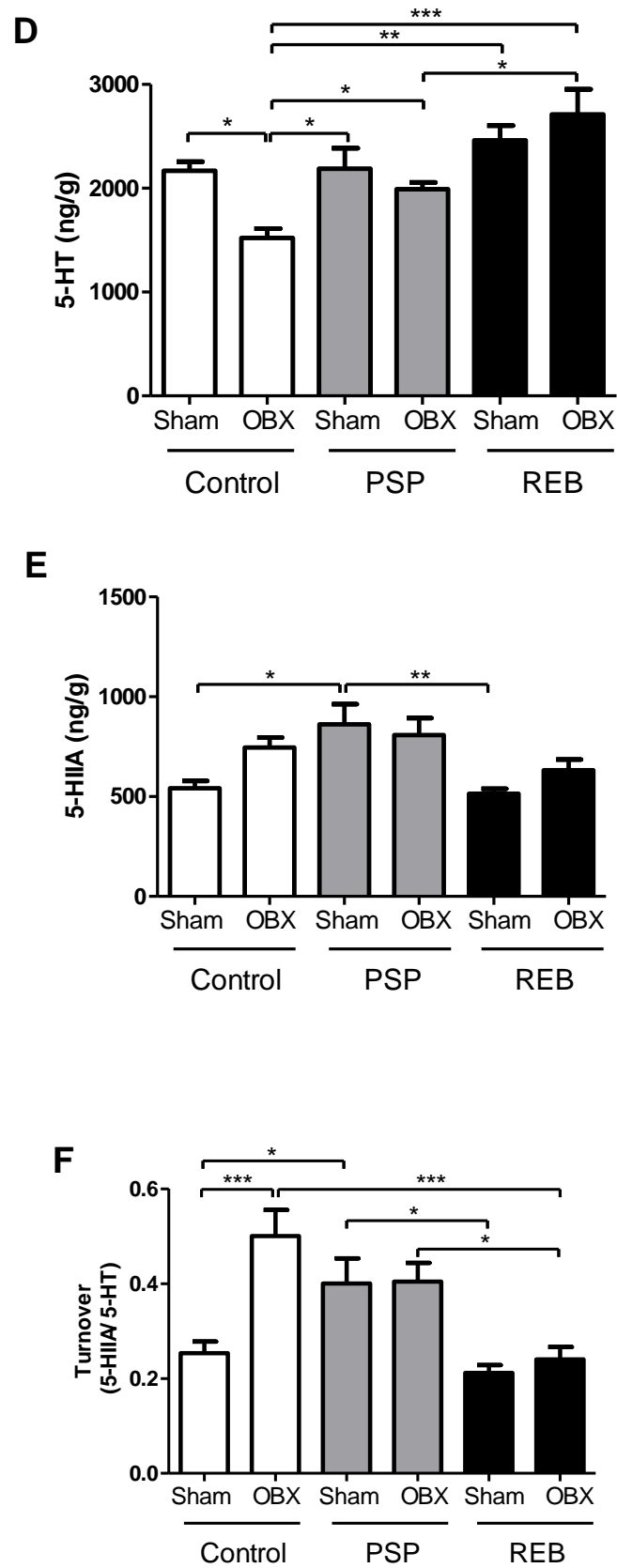


Figura 13: Quantificação dos níveis hipocâmpais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. (D) níveis de serotonina (5-HT); (E) níveis do

metabólito (5-HIA) e (F) *Turnover* (5-HIA/5HT). Os valores foram expressos como media \pm S.E.M. *P<0,05, **P<0,01 e *** P<0,001. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

A análise dos níveis de NA (Fig. 14G), indicou que o grupo OBX REB apresentou um aumento significativo em comparação com o grupo OBX controle (P <0,01) e OBX PSP (P <0,01), como demonstrado pelos fatores PSP [F (2,36) = 11,21; P = 0,0004], OBX [F (1,36) = 0,59, P = 0,45] e sua interação [F (2,36) = 1,01, P = 0,38]. Além disso, o metabolito DHPG (Fig. 14H), demonstrou estar aumentado no grupo sham PSP em comparação com os grupos sham controle (P <0,05) e sham REB (P <0,01). Já o grupo OBX PSP apresentou um aumento significativo desse metabolito quando comparado com os grupos controle OBX (P <0,01) e OBX REB (P <0,05), como revelado pelos fatores PSP [F (2,36) = 15,7, P <0,0001], OBX [F (1,36) = 0,02, P = 0,89] e interação [F (2,36) = 0,21, P = 0,81].

Finalmente, em relação ao *turnover* de NA hipocampal (Fig. 14I), o grupo sham PSP apresentou um aumento significativo neste parâmetro, em comparação com os grupos sham controle (P <0,01) e sham REB (P <0,001). Além disso, o OBX PSP exibiu um aumento neste parâmetro em relação ao controle OBX (P <0,001) e OBX REB (P <0,001), tal como revelado pelos fatores PSP [F (2,36) = 30,5, P <0,0001], OBX [F (1,36) = 0,02, P = 0,87] e interação [F (2,36) = 0,19, P = 0,8].

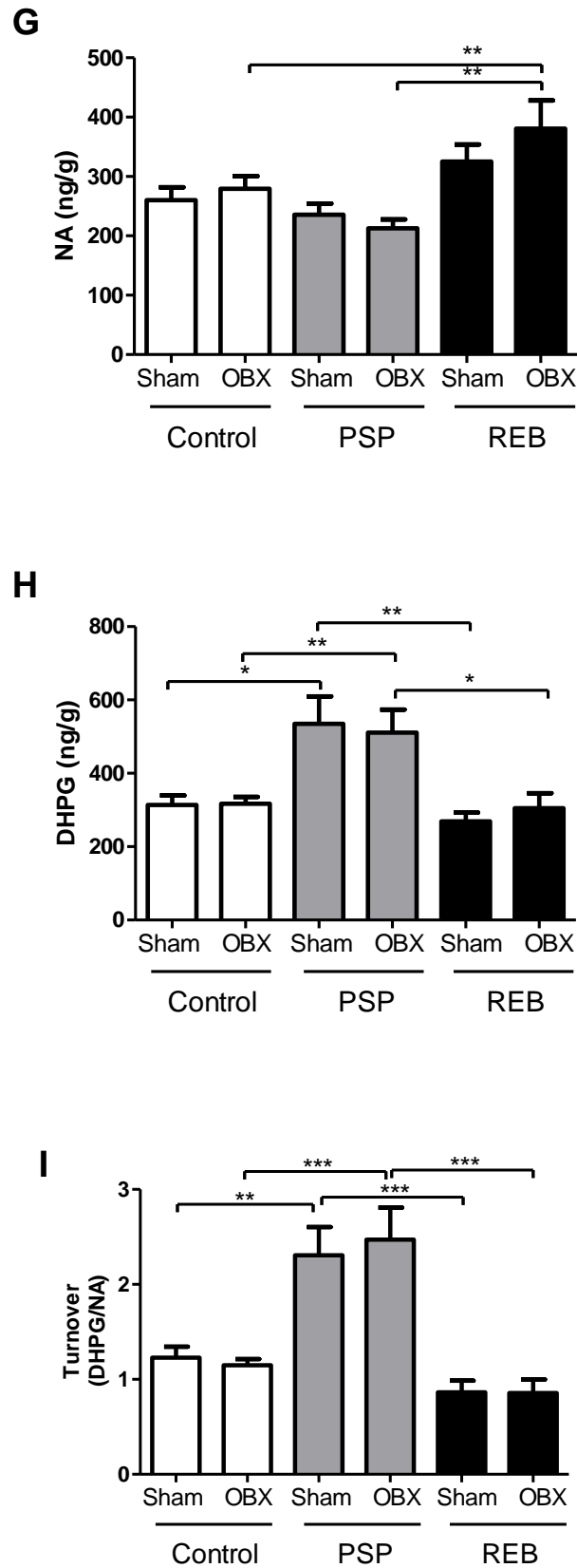


Figura 14: Quantificação dos níveis hipocâmpais de neurotransmissores, metabólitos e de seus *turnovers*. **(G)** níveis de noradrenalina (NA); **(H)** níveis do metabólito (DHPG) e **(I)** *Turnover* (5-HIAA/5HT). Os valores foram expressos como

media \pm S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. ANOVA de duas vias seguido de post hoc de Bonferroni.

6.6. CORRELAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS.

A Figura 15 apresenta os coeficientes de correlação de Pearson entre os procedimentos sham e OBX para vários parâmetros comportamentais e neuroquímicos quantificados imediatamente após a PSP e o período REB. Essa análise mostrou haver uma correlação moderada ($r = -0,45$; $P = 0,05$) entre os níveis nigrais de BDNF e o parâmetro de natação no grupo sham após os períodos de PSP e REB (Fig. 15A). Entretanto, detectou-se uma correlação significativa muito mais intensa ($r = 0,83$; $P < 0,0001$) desses mesmos parâmetros para o grupo OBX (Fig. 15B). Outros dois parâmetros que foram correlacionados e que apresentaram um padrão bastante semelhante ao observado anteriormente foram às concentrações nigrais de BDNF e os níveis de 5-HT no hipocampo dos animais. Nesse sentido observou-se que ocorreu uma correlação fraca ($r = -0,40$; $P = 0,07$) entre as concentrações nigrais de BDNF e os níveis hipocâmpais de 5-HT no grupo sham (Fig. 15C). Por outro lado, no grupo OBX demonstrou-se haver uma forte e significativa correlação ($r = 0,67$; $P = 0,004$) entre esses parâmetros, considerando os períodos de PSP e REB (Fig. 15D).

Devido à ocorrência de correlações fortes entre os níveis nigrais de BDNF e o parâmetro de natação, bem como entre esse fator neurotrófico e os níveis hipocâmpais de 5-HT, realizamos o mesmo tipo de análise estatística para os parâmetros natação e concentração hipocâmpal de 5-HT, para os dois grupos testados. Essa análise indicou ocorrer uma correlação fraca e não significativa entre tais parâmetros observados no grupo sham, considerando os períodos de PSP e REB. Entretanto, detectamos haver uma correlação forte e significativa ($r = 0,70$; $P = 0,003$) desses parâmetros para o grupo OBX (Fig. 15F).

Outros parâmetros também foram correlacionados de forma a tentar estabelecer novas relações entre os fatores analisados (Tabela 1). Observamos haver uma moderada, porém significativa, correlação entre BDNF e escalada ($r =$

0.43; $P = 0.05$) no grupo sham que, entretanto, não foi mantida no grupo OBX ($r = 0.29$; $P = 0.15$) (Tabela 1). Por outro lado, verificou-se que os níveis estriatais de NA correlacionaram de forma moderada, porém significativa com os níveis nigrais de BDNF, tanto no grupo sham ($r = 0.55$; $P = 0.02$) quanto no grupo OBX ($r = 0.57$; $P = 0.01$) (Tabela 1). Por fim, detectou-se uma forte correlação negativa ($r = -0.40$; $P = 0.07$) entre os níveis hipocâmpais de 5-HT e a concentração nigral de BDNF, que se manteve, porém de forma invertida, ou seja, agora correlacionando-se positivamente ($r = 0.66$; $P = 0.004$) no grupo OBX (Tabela 1).

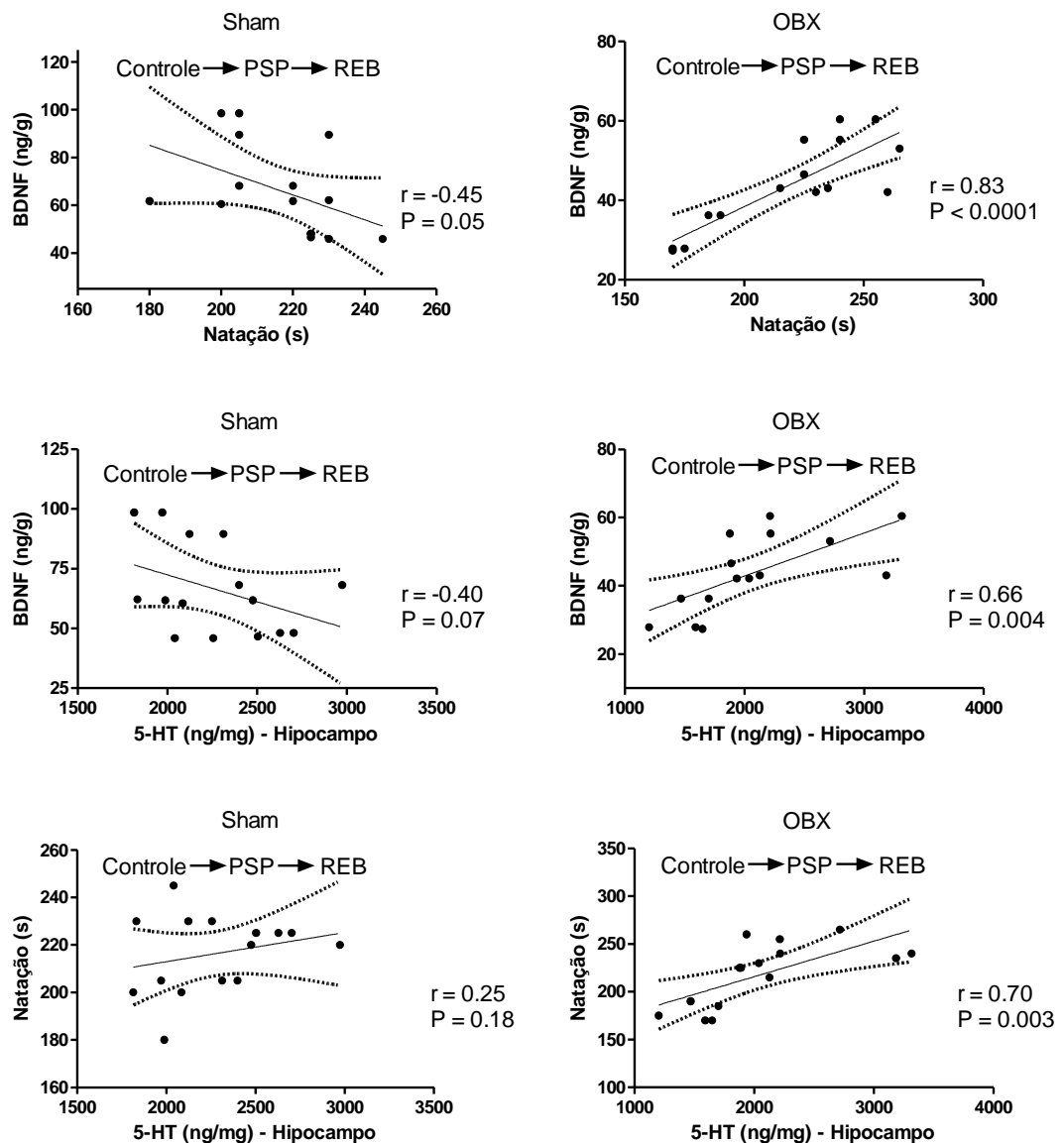


Figura 15: Correlações de Pearson entre diferentes parâmetros comportamentais e neuroquímicos obtidos após o período de PSP e REB dos grupos sham e OBX. **(A)** BDNF x natação – grupo sham; **(B)** BDNF x natação – grupo OBX; **(C)** BDNF x 5-HT hipocampal – grupo sham; **(D)** BDNF x 5-HT hipocampal – grupo OBX; **(E)** natação x 5-HT hipocampal – grupo sham; **(F)** natação x 5-HT hipocampal – grupo OBX. Os valores foram expressos em suas unidades originais e indicados nos eixos dos gráficos.

Tabela 1. Correlações de Person entre diferentes parâmetros comportamentais e neuroquímicos

Correlações	Grupos	
	Sham	OBX
BDNF vs Natação	$r = -0.45$; $P = 0.05$ *	$r = 0.83$; $P < 0.001$ *
BDNF vs Escalada	$r = 0.43$; $P = 0.05$ *	$r = 0.29$; $P = 0.15$
BDNF vs Imobilidade	$r = 0.43$; $P = 0.06$	$r = 0.30$; $P = 0.15$
<i>Estriado</i>		
5-HT vs BDNF	$r = -0.05$; $P = 0.42$	$r = 0.20$; $P = 0.23$
DA vs BDNF	$r = 0.12$; $P = 0.33$	$r = 0.15$; $P = 0.30$
NA vs BDNF	$r = 0.55$; $P = 0.02$ *	$r = 0.57$; $P = 0.01$ *
<i>Hipocampo</i>		
5-HT vs BDNF	$r = -0.40$; $P = 0.07$	$r = 0.66$; $P = 0.004$ *
DA vs BDNF	$r = -0.21$; $P = 0.22$	$r = -0.16$; $P = 0.29$
NA vs BDNF	$r = -0.05$; $P = 0.43$	$r = 0.29$; $P = 0.14$

*Correlações significativas

7. DISCUSSÃO

A depressão é um transtorno mental caracterizado por baixa auto-estima e pela perda de interesse ou prazer em atividades normalmente prazerosas (WANG *et al*, 2013). Podemos estabelecer, através da bulbectomia olfatória (RINWA *et al*, 2013), um modelo animal de depressão o qual desencadeia respostas comportamentais e neuroquímicas similares às encontradas em seres humanos, sendo que através desse modelo é possível analisar a magnitude do efeito de manipulações antidepressivas, como é o caso da PSP. Dentro desse contexto, a privação de sono é descrita como sendo capaz de gerar significativas alterações do humor como demonstrado por Gorgulu e Caliyurt (2009) onde indivíduos depressivos que foram submetidos à privação de sono apresentaram melhora clínica detectada pela Escala de Avaliação da Depressão de Hamilton (HAM-D).

Os efeitos antidepressivos de uma noite de privação de sono total tem sido documentados na literatura como sendo capazes de promover a melhora do humor de forma aguda e transitória, sendo que o ânimo retorna a sua linha de base em geral 24 horas após a privação de sono total (WU; BUNNEY, 1990). O mecanismo fisiológico por trás do efeito antidepressivo provocado pela privação de sono parece ser complexo e ainda pouco compreendido. Sabe-se que a neurogênese no hipocampo adulto pode estar reduzida na depressão, sendo, portanto, um importante aspecto fisiopatológico dessa condição (IBRAHIN *et al*, 2011). Observa-se que uma variedade de tratamentos antidepressivos reverte essa condição, levando ao aumento da neurogênese, essa pode ser também uma hipótese aplicada ao efeito da privação de sono e mudança do comportamento em modelos de depressão (ZUCONI, *et al*, 2006).

A bulbectomia olfatória bilateral provoca diversas mudanças de comportamento em ratos, dentre elas aumento do comportamento exploratório, alteração do comportamento sensorial, alterações cognitivas e de aprendizagem, bem como prejuízo nos parâmetros associados ao humor (MUCIGNAT-CARETTA *et al*, 2006; ASWAR *et al*, 2012). Nesse sentido, os resultados aqui apresentados para o teste do campo aberto sugerem que a hiperatividade encontrada após a bulbectomia olfatória pode ser considerada um comportamento relacionado à

tensão, sendo o resultado de uma hiperatividade “inata”, combinada com a incapacidade de resposta de adequação a uma situação estressante (HENDRIKSEN *et al*, 2012; PRIMEAUX; HOLMES,1999).

Além disso, essa resposta de hiperatividade pode ser relacionada a um comportamento tipo depressivo, uma vez que demonstrou-se que essa hiperatividade foi normalizada após a administração crônica de antidepressivos Imipramina e Escitalopram (BREUER *et al*, 2007). Como modelo animal de depressão, a bulbectomia olfatória gera seus efeitos não somente pela anosmia e sim por extensas lesões retrógradas em todas as áreas com as quais os bulbos olfatórios têm ligação como, córtex, amígdala e hipocampo acarretando degeneração neuronal, interrupções sinápticas, e destruições destas redes neuronais, onde o animal perde a capacidade de adapção a um novo ambiente ou estresse e avaliação de risco (WHEELER *et al*, 1995; KELLY *et al*, 1997; JESBERGE; RICHARDSON, 1988; GRECKSCH *et al*, 1997; WATANABE *et al*, 2003; RINWA *et al*, 2013).

Além das alterações motoras, déficits de memória também têm sido documentados em animais bulbectomizados sendo estes dificilmente revertidos haja vista o envolvimento do hipocampo, estrutura esta considerada, entre outras, responsável pelo aprendizado e memória (LEHAMANN, 2007; JAAKO-MOVITS;ZHARKOVSKY, 2005). Essa situação é evidenciada em diversos estudos como no realizado por Yamamoto (1994) que identificou prejuízos na memória de trabalho em animais OBX que tendiam a aumentar durante o tempo, sugerindo que a bulbectomia olfatória compromete o aprendizado e a memória, sendo esse efeito relacionado com a função colinérgica (YAMAMOTO *et al*, 1997; YAMAMOTO *et al*, 1994; HENDRIKSEN *et al*, 2012; BORRE *et al*, 2012; MUCIGNAT-CARETTA *et al*, 2006).

Araki (1980) demonstrou eletrofisiologicamente a ocorrência de uma redução significativa da porcentagem de sono paradoxal, durante a fase claro, em um intervalo de 24h com um aumento significativo da atividade locomotora de animais bulbectomizados 3 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, sugerindo, portanto, que a redução da manifestação do sono paradoxal pode desempenhar algum papel na indução da hiperatividade motora, sugerindo uma relação estreita entre essa fase do sono e a depressão (AKARI *et al*, 1980).

Ainda é interessante salientar que o efeito de hiperatividade motora não foi observado nos grupos sham submetidos à PSP, indicando que esse período de privação de sono (72 h) não foi capaz de promover uma modificação da resposta motora, de forma isolada, porém impediu a ocorrência da resposta de hiperatividade motora, caracteristicamente detectada no grupo OBX controle. A PSP tipicamente promove modulações no sistema dopaminérgico nigroestriatal no sentido de gerar reduções na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) (LIMA et al. 2012; LIMA et al. 2008a) com consequentes repercussões (como p.e. aumento de *turnover*) sobre os níveis de DA estriatal (Dos Santos et al. 2013). Esses fenômenos foram descritos, do ponto de vista comportamental, originalmente por Tufik e colaboradores que observaram haver um aumento das respostas motoras e de agressividade de animais privados de sono paradoxal por um período de 96 h (TUFIK et al. 1978). Além disso, constatou-se posteriormente a ocorrência de um aumento da capacidade de ligação à DA, por parte dos receptores dopaminérgicos estriatais (particularmente D2) (Nunes et al. 1994), mediante a PSP, fato este que coletivamente às alterações motoras advindas da PSP foi chamado de supersensibilidade dopaminérgica (LIMA ET AL. 2009a; TUFIK 1981a; TUFIK 1981b).

Diante disso, o protocolo adotado de 72 h de PSP não foi capaz de promover uma alteração na resposta motora compatível com o fenômeno da supersensibilidade dopaminérgica, de maneira típica, ou seja, com aumento da resposta locomotora. Esse resultado foi ao encontro dos dados neuroquímicos que indicaram haver um aumento dos níveis de DA estriatal no grupo sham REB, o que pode ser um indício de um efeito compensatório associado ao mecanismo biológico da supersensibilidade dopaminérgica. Além disso, observou-se um aumento na degradação de DA estriatal no grupo sham PSP, porém não observada no grupo OBX PSP. Entretanto, verificou-se uma ausência de alterações na taxa de renovação de DA estriatal entre os grupos sham PSP e OBX PSP, sugerindo que a restauração da resposta de hiperatividade motora tenha sido compensada plasticamente por esses neurônios nigroestriatais. Além disso, estudos reportam que a administração de drogas como a imipramina e o escitalopram é capaz de normalizar a resposta de hiperatividade motora induzida pela bulbectomia olfatória (Breuer et al. 2007), sugerindo uma possível participação da NA e 5-HT mediando esse efeito.

Da mesma forma o comportamento depressivo dos animais bulbectomizados também foi observado no teste da natação forçada, onde foi evidenciada uma diminuição significativa do parâmetro de natação para o grupo OBX controle quando comparado ao sham controle, assim como dos níveis hipocâmpais de 5-HT. Por outro lado, a PSP gerou um efeito antidepressivo ao aumentar o tempo de natação, bem como a concentração hipocâmpal de 5-HT, tanto no grupo sham PSP, quanto no grupo OBX PSP, comparados ao grupo OBX controle. Esse efeito antidepressivo induzido pela PSP parece ter repercutido até o período REB, haja vista o aumento do tempo de natação do grupo OBX REB, comparado ao OBX controle, bem como o aumento da concentração de 5-HT hipocâmpal observada no grupo OBX REB, comparado ao grupo OBX PSP. Em relação ao parâmetro escalada observamos uma diminuição significativa entre o grupo OBX controle quando comparado aos grupos sham PSP e OBX PSP, sem alterações significativas do neurotransmissor NA, porém com aumento significativo de seu metabólito entre o grupo sham controle e sham PSP e o grupo OBX controle e OBX PSP, da mesma maneira em que também evidenciamos um aumento significativo na taxa de renovação da NA, hipocâmpal, entre os mesmos grupos, a tal ponto que após o período rebote encontramos um aumento significativo de NA entre o grupo OBX rebote quando comparado ao OBX controle e OBX PSP, e aumento significativo do parâmetro escalada entre o grupo OBX REB em relação ao grupo OBX PSP, mostrando mais uma vez que o efeito antidepressivo da PSP repercutiu após o período REB.

Ainda em relação ao teste da natação forçada, quanto ao parâmetro imobilidade, observamos um aumento do tempo de imobilidade após a cirurgia de bulbectomia como descrito por outros autores, porém, após a PSP encontramos uma redução significativa da imobilidade no grupo OBX PSP, associados a níveis de degradação, e *turnover*, de DA hipocâmpal também significativamente aumentados para o grupo sham PSP quando comparado ao grupo OBX PSP. (KINWA; KUMAR; GARG, 2013; SONG; LEONARD, 2005)

O bulbo olfatório constitui uma parte importante do sistema límbico em ratos, sendo que lesões ou mesmo a ressecção do mesmo provoca degradação neuronal e remodelação de cadeias neuronais para outras áreas encefálicas com córtex, hipocampo, amígdala, locus coeruleos e núcleo dorsal da rafe (HARKIN; KELLY LEONARD, 2003). Dentre essas estruturas o hipocampo sofre grande atrofia dentrítica após a bulbectomia olfatória, modificando sua atividade neuronal levando

a uma maior vulnerabilidade de seus neurônios, produzindo os prejuízos comportamentais encontrados nesse modelo de depressão sugerindo uma forte correlação entre os comportamentos tipo-depressivos encontrada e o hipocampo (JAAKO-MOVITIS et al, 2006).

O efeito antidepressivo promovido pela PSP foi descrito inicialmente por Vogel (1975) em que evidenciou uma melhora nos parâmetros de humor de voluntários sendo comparáveis aos efeitos produzidos por antidepressivos com uma magnitude semelhante. Em geral, a melhora clínica pode ser detectada pelos sinais e sintomas de depressão através de testes subjetivos (GIEDKE; SCHWARZLER 2002), incluindo um rápido aumento nos níveis de BDNF circulante. Esse fator neurotrófico está diretamente relacionado às alterações na plasticidade neuronal, sendo que ele tem sido implicado tanto na etiologia depressão quanto nos mecanismos de ação de drogas antidepressivas (NIBUYA et al, 1999; CASTRÉN; RANTAMAKI, 2009). Nesse sentido, Gorgulu e Caliyurt submeteram 22 voluntários deprimidos a 48 horas de privação de sono total e compararam os efeitos deste protocolo a um outro grupo de 19 voluntários também deprimidos tratados exclusivamente com sertralina. Eles identificaram um aumento sinérgico do BDNF sérico dos indivíduos tratados com sertralina mais privação de sono total, quando comparado ao grupo tratado apenas com sertralina (GORGULU;CALIYURT, 2009).

A quantidade e o tempo de sono rebote parecem ser fatores que influenciam a resposta a privação de sono (GIEDKE *et al*, 1992), fato este também evidenciado em nosso estudo em que os níveis de BDNF na SNpc foram significativamente aumentados no grupo OBX PSP comparado ao grupo OBX controle, efeito este que perdurou até o período de sono rebote. Em concordância com esse resultado, descreve-se na literatura que a PSP pode aumentar os níveis de fatores neurotróficos no encéfalo, mais especificamente do BDNF, onde este apresenta uma estreita ligação com a 5-HT (MARTINOWICH ; LU , 2008). BDNF e 5-HT são moléculas distintas, mas que desempenham papéis reguladores em muitas funções neuronais, incluindo a sobrevivência, a neurogênese e a plasticidade sináptica, sendo uma característica comum à capacidade de regular o desenvolvimento e a plasticidade de circuitos neurais envolvidos em distúrbios de humor tais como a depressão (MARTINOWICH ; LU , 2008). O BDNF promove a sobrevivência e diferenciação de neurônios serotoninérgicos, com alterações específicas do sono onde apesar de queixarem-se de sonolência, os pacientes deprimidos apresentam

uma melhora significativa de humor depois de uma noite de privação de sono (ADRIEN, 2002).

A melhora do humor deprimido promovida pela PSP parece ser de mesma magnitude que aquela gerada por drogas antidepressivas, sendo que a eficácia dessas drogas parece estar positivamente relacionada com a capacidade delas em gerar reduções de sono paradoxal (Vogel 1983). Além disso, observou-se que administrações agudas de fluoxetina em ratos foram capazes de gerar um efeito muito similar sobre o sono que outros antidepressivos, ou seja, supressão do sono paradoxal (Wang et al. 2012).

Para confirmar a relação entre o comportamento tipo-depressivo, a expressão de BDNF nigral e os níveis de 5-HT no hipocampo, foi utilizado o teste de correlação de Pearson que demonstrou haver, para o grupo sham uma fraca correlação negativa entre os níveis de BDNF nigral e o comportamento de natação ao longo dos diferentes períodos analisados (PSP e REB). Entretanto, a mesma análise revelou haver uma inversão desse padrão, ou seja, sugerindo que a bulbectomia olfatória foi capaz de promover um aumento dos níveis de BDNF na SNpc que foram responsáveis pelo aumento no tempo de natação desses animais. Além disso, esse efeito antidepressivo atribuído a PSP foi detectado maximamente no período REB, indicando uma modulação prolongada desse efeito antidepressivo. Esse resultado é confirmado por outros dados que apontam que pacientes deprimidos apresentam melhora de humor apenas após o período de REB (Giedke et al. 1992). A correlação entre os níveis nigrais de BDNF e a concentração de 5-HT hipocampal apontam que o mesmo tipo de efeito foi detectado, ou seja, a ocorrência de uma correlação positiva e mais forte (e estatisticamente significativa) mediante a ocorrência da bulbectomia olfatória. Sugerindo, portanto, que quanto maiores a expressão de BDNF na SNpc maiores devem ser as concentrações hipocampais de 5-HT, sendo este efeito ser produto da PSP e REB no grupo OBX.

Por fim, a correlação estabelecida entre o parametro da natação e os níveis hipocampais de 5-HT indicam haver uma forte correlação positiva entre tais parâmetros, mediante a PSP e o período REB para o grupo OBX. Nesse sentido, dados da literatura apontam que a PSP por 24 h (realizada através do método do disco) promoveu um aumento da 5-HT hipocampal após o período de privação e de rebote (LOPEZ-RODRIGUES et al, 2003). Outro trabalho demonstrou que a privação de sono total por 12 h, pelo método do *gentle handling*, promoveu um

aumento na proliferação neuronal no giro denteado observado 15 e 30 dias após o período de privação de sono, sugerindo um efeito dessa manipulação sobre a maturação de neurônios, bem como neurogênese hipocampal (ZUCCONI, 2006).

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a PSP parece ser capaz de promover um efeito antidepressivo associado ao aumento da expressão nigral de BDNF, bem como gerando aumento nas concentrações hipocampais de 5-HT, ambos promovendo um impacto comportamental de aumento do parâmetro natação. Entretanto, esse efeito antidepressivo parece ocorrer apenas mediante a presença de um insulto gerador de alterações (moleculares e comportamentais) que mimetizem a depressão, como a bulbectomia olfatória. Do contrário, a PSP parece não promover alterações benéficas nesses parâmetros, fato este demonstrado pelas correlações negativas evidenciadas nos grupos sham. O mecanismo neurobiológico comum resultante do tratamento farmacológico com antidepressivos mediante PSP sugere, portanto, que a redução do sono (particularmente do sono paradoxal), ou mesmo a insônia manifestada clinicamente em grande parcela de pacientes deprimidos, possa ser um mecanismo compensatório endógeno que teria mais um papel terapêutico do que meramente patológico (ADRIEN, 2002).

8. CONCLUSÕES

Os achados obtidos a partir do modelo de depressão induzido por bulbectomia olfatória confirmam os efeitos antidepressivos promovidos pela PSP, os quais estão correlacionados com aumentos na transmissão serotoninérgica hipocampal, bem como a elevação da expressão nigral do BDNF como sumarizados a seguir:

- A bulbectomia olfatória foi capaz de promover alterações tipo-depressivas, caracterizando-se como um modelo animal de depressão
- A PSP, de acordo com o protocolo utilizado, foi capaz de gerar efeitos antidepressivos no teste da natação forçada modificada que foram detectados inclusive após o período REB
- Os resultados sugerem que todas as monoaminas avaliadas sofreram alguma modulação mediante os períodos de PSP e REB testados, em decorrência da bulbectomia olfatória, sendo a 5-HT o neurotransmissor mais relacionado com o efeito antidepressivo observado
- O BDNF apresentou uma redução de sua expressão na SNpc frente a bulbectomia olfatória que foi revertida pela PSP, sendo que esse efeito se manteve após o período REB

Entretanto, esses mecanismos associados ao efeito antidepressivo da PSP parecem ocorrer apenas mediante a presença de um insulto que mimetize a depressão, como a bulbectomia olfatória. Esses resultados vão ao encontro a outros estudos que comprovam que a PSP ser utilizada como uma estratégia terapêutica para a depressão. Mas principalmente, o presente trabalho sugere, por meio de fortes evidências, um mecanismo desencadeado pela PSP que pode explicar, pelo menos em parte, a relação neurobiológica entre a depressão e o sono paradoxal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, A., 2005. Neuroscience: while you were sleeping. *Nature*. 437:1220-2.

Adrien J. 2002. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *SleepMed Rev* 6(5):341-351.

Anderson K.N., Bradley A.J.. 2013. Sleep disturbance in mental health problems and neurodegenerative disease. *Nat Sci Sleep*. 5: 61–75.

Anderson KD, Alderson RF, Altar CA, DiStefano PS, Corcoran TL, Lindsay RM et al (1995). Differential distribution of exogenous BDNF, NGF, and NT-3 in the brain corresponds to the relative abundance and distribution of high-affinity and low-affinity neurotrophin receptors. *J Compar Neurol* 357: 296.

Appel S.H. 1981. A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease. *Ann. Neurol*. 10: 499–505.

Araki H., Yamamoto T., Watanabe S., Uek S.. 1980. Changes in sleep-wakefulness pattern following bilateral olfactory bulbectomy in rats. *Physiology e Behavior*. 24(1). 73–78.

Aswar U.M., Kalshetti P.P., Sharad B.H., Bodhankar S. L.. 2012. Effect of newly synthesized 1,2,3,4-triazino[5,6-b]indole-3-thione derivatives on olfactory bulbectomy induced depression in rats. *Asin Pac I Trop Biomed* 2(12):992-998.

Azua S.R., Matute C., Stertz L., et al. 2013. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels, learning capacity and cognition in patients with first episode psychosis. *BMC Psychiatry*. 13: 27.

Barbara Schneider B., David Prvulovic D., Oertel-Kno V. Kno C.C. Britta Reinke B., Grexa M., Weber B., Hampel H.. 2011. Biomarkers for major depression and its delineation from neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiologi*. 95(4):703-17.

Borre Y, Sir V, de Kivit S, Westphal KG, Olivier B, Oosting RS. 2012. Minocycline restores spatial but not fear memory in olfactory bulbectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2012 Dec 15;697(1-3):59-64.

Breur M.E., Groenink L., Oosting R., Westenberg H. G.M., Oliver B. 2007. Long-term behavioral changes after cessation of chronic antidepressant treatment in olfactory bulbectomized rats. *Biological Psychiatry*. 61(8): 990-995.

Broadhurst, P. L., 1960. Experiments in psychogenetics. In: Einsenck, H. J. (Ed), *Experiments in Personality* Routledge and Kegan Paul, London, 52-71.

Cairncross, k. D.;cox, b.;forster, c.;wren, a. F. 1978.A new model for the detection of antidepressant drugs: Olfactory bulbectomy in the rat compared with existing models. *Journal of Pharmacological Methods*, p.131–143.

Castrém E., Rantamäki T.. 2010. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. *Neurobiology* 70(5).

Cairncross K. D.;Cox *et al.* 1978 A new model for the detection of antidepressant drugs: Olfactory bulbectomy in the rat compared with existing models. *Journal of Pharmacological Methods*, p.131–143.

Cirelli C.. 2013. Sleep and synaptic changes: *Current Opinion in Neurobiology*, 23:1–6.

Clark P.C., Brown G.G., Archibald S.L., Fennema-Notestine C., Braun D.R., Thomas L.S., Sutherland A.N., Gillin J.C..2006. Does amygdala perfusion correlate with antidepressant response to partial sleep deprivation in major depression? *Science Direct*, 146:43-51.

Colton, H., Altevogt, B. 2006. Sleep disorders and sleep deprivation: An unmet public health problem. Washington. National Academies Press.

Cooper A.M., Robert M.. 1981. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd Ed: *Am J Psychiatry*. 138:128-129.

Datta S., MacLean R.R.. 2007. Mechanisms for the Regulation of Mammalian Sleep-Wake Behavior: Reinterpretation of Historical Evidence and Inclusion of Contemporary Cellular and Molecular Evidence. *Neurosci Biobehav Rev.* 31(5): 775–824.

Davis H, Davis PA, Loomis AL, Harvey EN, Hobart G. 1937. Changes in Human Brain Potentials during the Onset of Sleep. *Science* 86(2237):448-450.

De Prato Primeaux S., P.V. Holmes P.V.. 1999. Role of aversively motivated behaviour in the olfactory bulbectomy syndrome. *Physiol Behav*, 67, pp. 41–47.

Dementienko V.V., Dorokhov V.B. 2013. Estimation of efficiency of fatigue monitoring devices considering the occurrence of the instability of nature of falling a sleep errors. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* 63 (1):24-32.

Detke, M. J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121, 66-72.

Deussing, J. M., 2006. Animal Models of Depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* 3, 375-383.

Djalali S, Holtje M, Grosse G, Rothe T, Stroh T, Grosse J et al (2005). Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurons during development. *J Neurochem* 92: 616.

Dos Santos AC, Castro MA, Jose EA, Delattre AM, Dombrowski PA, Da Cunha C, Ferraz AC, Lima MM. 2013. REM sleep deprivation generates cognitive and

neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* in press.

Duman R.S., Heninger G.R., Nestler E.J. 1997. A molecular and cellular theory of depression/ *Arch Gen Psychiatry*, 54:597–60.

Duman R.S., Malberg J., Nakagawa S., As C.D. 2000. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry*, 48:732–739.

Dusan-Peyrethon D., Peyrethin J., Jouvet M., 1967. Quantitative study of phasic phenomena of paradoxal sleep during and after its instrumental deprivation. *C R Seances Soc Biol Fil.* 161, 2530-3.

Dwe M.A., Reynolds C.F., Buysse D.J. et al . 1996. EEG sleep profiles during depression: effects of episode duration and other and psychosocial factors in older adults. *Arch Gen Psychiatry*. 53:148-156.

Dzirasa K., Ribeiro S., Costa R., Santos L.M., Lin, S.C., Grosmark A., Sotnikova T. D., Gainetdinov R.R., Caron M. G., Nicolelis M. A., 2006. Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci*. 26, 10577-89.

Elfving, B., Plougmann, P. H., Wegener, G., 2010. Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. *J Neurosci Methods* 187, 73-77.

España R.A., Scammell T.E. 2011. Sleep Neurobiology from a Clinical Perspective. *Sleep*. 34(7):845-58.

Fairholme C.P., Nosen E.L., Nillni Y.I., Schumacher J.A., Tull M.T., Coffey S.F. 2013. Sleep disturbance and emotion dysregulation as transdiagnostic processes in a comorbid sample. *Behav Res Ther*. 2013 51(9):540-546.

Fernandes R., Stone P., Andrews P., Morgan R., Sharma S. 2006. Comparison between fatigue, sleep disturbance, and circadian rhythm in cancer inpatients and healthy volunteers: evaluation of diagnostic criteria for cancer-related fatigue. *J Pain Symptom Manage*. 32: 245-54.

Ford D.E., Kamerow D.B. 1989. Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention. *JAMA* 15:262(11):1479-84.

Francesco A., Luigi A., Jiménez P.V., Aleksander M. 2000. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *Neurochemistry* 11(6):1369-1373.

Giedke H., Schwärzler F. 1992 Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep Medicine Reviews*. 6(5) 361-377.

Gillin J.C. 1983. The sleep therapies of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 7:351–364.

Gorgulu Y., Caliyurt O.. 2009 Rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy correlates with serum BDNF changes in major depression. *Brain Res Bull.* p:158-62.

Gottesmann C., Gottesman I. 2007. The neurobiological characteristics of rapid eye movement (REM) sleep are candidate endophenotypes of depression, schizophrenia, mental retardation and dementia. *Progress in Neurobiology* 81: 237–250.

Grecksch G., Zhou D., Franke C., Schröder U., Sabel B., Becker A., Huether G.. 1997. Influence of olfactory bulbectomy and subsequent imipramine treatment on 5-hydroxytryptaminergic presynapses in the rat frontal cortex: behavioral correlates. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1725–1731.

Gupta A.K., Gupta M.A. Sleep-wake disorders and dermatology. *Clinics in Dermatology* (2013) 31, 118–126.

Harkin, A. K., J. P.; Leonard, B. E., 2003. A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clinical Neuroscience Research* 3, 253-264.

Harvey. A.G., Murray G., Chandler R.A., Soehner A. 2011. Sleep Disturbance as Transdiagnostic: Consideration of Neurobiological Mechanisms. *Clin Psychol Rev* 31(2): 225–235.

Hellweg R., Zueger M., Fink K., Hortnagl H.. 2007. Gass Olfactory bulbectomy in mice leads to increased BDNF levels and decreased serotonin turnover in depression-related brain areas *Neurobiol. Dis.* 25: 1–7.

Hemmeter UM, Hemmeter-Spernal J, Krieg JC (2010) Sleep deprivation in depression. *Expert Rev Neurother* 10:1101–1115.

Hendriksen H., Meulendijks D., Douma T.N., Bink D. I., Breuer M.I., Westphal K.G.C., Olivier B., Oosting R.O. 2012. Environmental enrichment has antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. *Neuropharmacology* 62(1):270–277.

Hilakivi I. 1987. Biogenic amines in the regulation of wakefulness and sleep. *Med Biol.* 65(2-3):97-104

Ibrahim L., Duncan W., Luckenbaugh D., Yuan P., Machado-Vieira R., Zareta C.. 2011. Rapid antidepressant changes with sleep deprivation in major depressive disorder are associated with changes in vascular endothelial growth factor (VEGF): a pilot study. *Brain Res Bull.* August 10; 86(1-2); 129-133.

Jaako-Movits K, Zharkovsky A. 2005. Impaired fear memory and decreased hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. *Eur Neurosci* 22(11):2871-2878.

Jesberger J. A., Richardson J. S. 1988. Brain output dysregulation induced by olfactory bulbectomy: an approximation in the rat of major depressive disorder in humans. *J. Neurosci.* 38, 241–265.

Kapczinski F., Frey B.N., Kauer-Sant'Anna M., Grassi-Oliveira R.. 2008. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother.* 8(7):1101–1113.

Kátai Z., Ádori C., Kitka T. Vas S., Kalmár L., Kostyalik D., Tóthfalusi L., Palkovits M., Bagdy G. 2013. Acute escitalopram treatment inhibits REM sleep rebound and activation of MCH-expressing neurons in the lateral hypothalamus after long term selective REM sleep deprivation. *Psychopharmacology* 228(3):439-49.

Kelly, J. P., Wrynn, A. S., Leonard, B., 1997. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacology & Therapeutics* 74, 299-316.

Küllli Jaako-Movits, Tamara Zharkovsky, Martin Pedersen, Alexander Zharkovsky. 2006. Decreased Hippocampal Neurogenesis Following Olfactory Bulbectomy is Reversed by Repeated Citalopram Administration. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Volume 26, Issue 7-8, pp 1557-1568 .

Kupfer D.J., Ehlers C.L., Frank E., Grochocinski V.J., McEachran A.B. 1991. EEG sleep profiles and recurrent depression. *Biol Psychiatry*. 30 (7):641-55.

Lehmann, H., Lacanilao, S., Sutherland, R.J.. 2007. Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1278e1286.

Levine E.S., Crozier R.A., Black I.B., Plummer M.R. 1998. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-d-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci.* 95(17): 10235–10239

Lima MM, Andersen ML, Reksidler AB, Ferraz AC, Vital MA, Tufik S. 2012. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(4):359-368.

Lima MM, Reksidler AB, Vital MA. 2009a. The neurobiology of the substantia nigra pars compacta: from motor to sleep regulation. *J Neural Transm Suppl*(73):135-145.

Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Silva A, Zager A, Zanata SM, Vital MA, Tufik S. 2008a. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav Brain Res* 188(2):406-411.

Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MABF, Tufik S. 2007a. Effects of sleep deprivation on tyrosine hydroxylase expression and dopamine-related behaviors in two models of Parkinson's Disease. *Sleep Medicine* 8, Suppl 1:S103.

Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MABF, Tufik S. 2007b. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2:e513.

Lima MMS, Reksidler AB, Vital MABF. 2008b. The dopaminergic dilemma: Sleep or wake? implications in Parkinson's disease. *Bioscience Hypothesis* 1:9-13

Loew D. M., Spiegel R., 1976. Polygraphic sleep studies in rats and humans: their use in psychopharmacological research. *Arzneimittelforschung*. 26, 1032-5

Lopez-Rodriguez F., Wilson C.L., Maidment. N.T., Poland. R.E., Engel J.. 2003 Total sleep deprivation increases extracellular serotonin in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 121(2):523-30.

Lucchesi L.M. Pradella-Hallinan M., Lucchesi M., Moraes W.A.S..2005. O sono em transtornos psiquiátricos. *Revista Brasileira de Psiquiatria. Suplemento* 1:27-32.

Lustberg L., Reynolds C.F. 2000. Depression and insomnia: Questions of cause and effect. *Sleep Medicine Reviews* 4: 253–262.

Madhav TR, Pei Q, Zetterstrom TS (2001). Serotonergic cells of the rat raphe nuclei express mRNA of tyrosine kinase B (trkB), the high-affinity receptor for brain derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res* 93: 56

Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* 15: 7929–7939.

Martinowich K, Lu B, 2008. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 33 (1):73-83.

McCarley R.W. 1982. REM sleep and depression: common neurobiological control mechanisms. *Am J Psychiatry*.139:565-570

Merlio J.P., Ernfors P., Jaber M., Persson H. (1992). Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51: 513

Mignot E., Taheri S., Nishino S.. 2002. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci*. 5(suppl):1071-5.

Monti JM, Monti D. 2007. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. *Sleep Med Rev* 11(2):113-133.

Monti JM. 1982. Catecholamines and the sleep-wake cycle. I. EEG and behavioral arousal. *Life Sci* 30(14):1145-1157.

Mucignat-Caretta, C., Bondi, M., Caretta, A., 2006. Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice. *Physiol Behav* 89, 637-643.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539–7547.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.* 15(11):7539-47.

Nunes GP, Tufik S, Nobrega JN. 1994. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. *Brain Res Bull* 34(5):453-456.

Pace-Schott EF, Hobson J.A.. 2002. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nature Revist Neuroscienc.* 3(9):591-605.

Palagini L., Baglioni C., Ciapparelli A., Angelo Gemignani A., Riemann D.. 2013. REM sleep dysregulation in depression: State of the art. *Sleep Medicine Reviews* 17 (5):377-90.

Palma B.D., Tiba P.A., Machado R.B., Tufik S., Suchecki D.. 2007 Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamicpituitary-adrenal axis as a modulatory factor. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 29(Supl I):S33-8

Paxinos G., Watson C.,1972. *The Rat Brain. Compact Third edition.*

Peng H.L., Chang Y.P.. 2013. Sleep Disturbance in Family Caregivers of Individuals With Dementia: A Review of the Literature. *Perspectives in Psychiatric Care* 49 (2013) 135–146

Phillip A.J.K., Robinso P.A., Klerman E.A.. 2013. Arousal state feedback as a potential physiological generat or of the ultradian REM/NREMsleep cycle. *J. of Theoretical Biolity* 319:75-87.

Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732

Portas CM, Bjorvatn B, Fagerland S, Grønli J, Mundal V, Sorensen E, Ursin R.. 1998. On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat. *Neuroscience.* 83 (3):807-14.

Rechtschaffen A, Kales A. 1968. A manual of standardized terminology techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. . (National

Institutes of Health Publication No 204) Washington, DC: US Government Printing Office.

Rechtschaffen A., Kales A..1969. A manual of standardized terminology techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Arch Gen Psychiatry. 20(2):246-247

Rumajogee P, Madeira A, Verge D, Hamon M, Miquel MC (2002). Up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype in vitro: BDNF and cAMP share Trk B-dependent mechanisms. J Neurochem 83: 1525.

Sahayadhas A., Sundaraj K., Murugappan M.. 2013. Drowsiness detection during different times of day using multiple features. Australas Phys Eng Sci Med. 36(2):243-50.

Salomon R.M., Delgado P.L., Licinio J., Krystal J.H., Heninger G.R., Dennis S. Charney D.S.. 1994. Effects of Sleep Deprivation on Serotonin Function in Depression.

Santos CA, Andersen ML, Lima MM, Tufik S. 2008. Gentle handling temporarily increases c-Fos in the substantia nigra pars compacta. Braz J Med Biol Res 41(10):920-925.

Saper C.B., Chou C.T., Scammell T.E.. 2001. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. Neurosciences 24(12):276-31

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J., Scammell, T.E., 2010. Sleep state switching. Neuron 68, 1023–1042.

Saper, C.B., Lu, J., Chou, T.C., Gooley, J., 2005. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. Trends Neurosci. 28, 152–157.

Sato, A., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Onogi, H., Niijima, F., Tadano, T., 2010. Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. Behav Brain Res 215, 141-145.

Savelyev S.A., Rantama K. T., Rytko.,K.M. Nen K.M. R., Castren E., Porkka-Heiskanen T. 2012. Sleep homeostasis and depression: studies with the rat clomipramine model of depression: Neuroscience 212 :149–158.

Sen S., Duman R., Sanacora G.. 2008. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. Biol Psychiatry 64(6):527–32.

Siegel J.M.. 2009. The neurobiology of sleep. Semin Neurol. Sep;29(4):277-96.

Song, C., Leonard, B. E., 2005. The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. Neurosci Biobehav Rev 29, 627-647.

Teche S.P., Nuernberg G.L., Sordi A.O., Souza L.H., Remy L., Cereser K.M.M., Rocha N.S. 2013. Measurement Methods of BDNF Levels in Major Depression: A Qualitative Systematic Review of Clinical Trials. *Psychiatr* apr 7.

Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. 1978. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 16(2):98-105.

Tufik S. 1981a. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM-sleep deprivation. *Psychopharmacology (Berl)* 72(3):257-260.

Tufik S. 1981b. Increased responsiveness to apomorphine after REM sleep deprivation: supersensitivity of dopamine receptors or increase in dopamine turnover? *J Pharm Pharmacol* 33(11):732-738.

Ursin R. 2002. Serotonin and sleep. *Sleep Medicine Reviews* 6(1)55–67

Vein, A.M., Levin I.A.. 1991. Sleep deprivation and brain pathology. *Sov Med.* 11-4.

Vogel, G.W. 1975. A review of REM sleep deprivation. *Arch Gen Psychiatry* 32:749-761.

Vogel G. W., Vogel F., McAbee R.S Thurmand A.J. 1980. Improvement of Depression by REM Sleep Deprivation: New Findings and a Theory. *JAMA Psychiatry* 37(3).

Vogel G.W. 1983. Evidence for REM sleep deprivation as the mechanism of action of antidepressant drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 7(2-3):343-349.

Volk S.A., Kaendler S.H., Hertel A., Maul F.D., Manoocheri R., Weber R., Georgi K., Pflug B., Gustav Hör G. 1997. Can response to partial sleep deprivation in depressed patients be predicted by regional changes of cerebral blood flow? *Psychiatry Research* 75(2):67–74

Wang Y., Yang Y., Hui L. Tie C. Li F., Xu Z.D., Wang C.. 2013. A neuropeptide y variant (rs16139) associated with major depressive disorder in replicate sample from chinese han population. *PLOS One.* 8(2):e 57042.

Watanabe A., Tohyama Y., Nguyen K. Q., Hasegawa S., Debonnei G., Diksic M. 2003. Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: an autoradiographic study. *J. Neurochemistry* 85(2):469-475.

Wheeler D., Boutelle M.G., Fillenz M..1995. The role of N-methyl-d-aspartate receptors in the regulation of physiologically released dopamine *Neuroscience,* 65: 767–774

Wichniak. Wierzbicka A., Jernajczyk W..2012. Sleep and Antidepressant

Treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 18: 5802-5817

Wu J.C., Bunney W.E. 1990. The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. *Am J Psychiatry*. Jan;147(1):14-21.

Yamamoto T, Jin J, Watanabe S. 1997. Characteristics of memory dysfunction in olfactory bulbectomized rats and the effects of cholinergic drugs. *Behav Brain Res*. 83(1-2):57-62

Yamamoto T., Kitajima I., Hironaka K., Ueki, S.S.. 1994. Watanabe Olfactory bulbectomy leads to learning/memory impairments in 3-panel runway and 3-lever operant tasks. *Yakubutsu Seishin Kodo*, 14, pp. 279–290.

Yasemin Gorgulu Y., Caliyur O.. 2009. Rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy correlates with serum BDNF changes in major depression *Brain Research Bulletin* 80 (3):158–162

Zant J.C., Leenaars C.H.C., Kostin A. et al. 2011. Increases in extracellular serotonin and dopamine metabolite levels in the basal forebrain during sleep deprivation. *Brain Res*. 1399:40-8

Zhou FC, Sari Y, Zhang JK (2000). Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 119: 33

Zucconi GG, Cipriani S, Balgkouranidou I, et al. 2006. 'One night' sleep deprivation stimulates hippocampal neurogenesis. *Brain Research Bulletin*. 69:375–381.

