

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA SEXUAL EM MODELO DE MANIA INDUZIDA POR
PRIVAÇÃO DE SONO EM RATOS WISTAR**

CURITIBA
2018

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA SEXUAL EM MODELO DE MANIA INDUZIDA POR
PRIVAÇÃO DE SONO EM RATOS WISTAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Segantine Dornellas

CURITIBA
2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Souza, Camila Pasquini de

Avaliação da diferença sexual em modelo de mania induzida por privação de sono em ratos Wistar. / Camila Pasquini de Souza. – Curitiba, 2018.
70 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Roberto Andreatini

Co-orientadora: Ana Paula Segantine Dornellas

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

1. Transtorno bipolar. 2. Transtornos do humor. 3. Estradiol. 4. Ovariectomia.
I. Título II. Andreatini, Roberto. III. Dornellas, Ana Paula Segantine. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 612.8



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA PASQUINI DE SOUZA** intitulada: "**Avaliação da diferença sexual em modelo de mania induzida por privação de sono REM em ratos Wistar**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovada no rito de defesa.

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

Curitiba, 19 de Fevereiro de 2018.

ROBERTO ANDREATINI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Avaliador Interno (UFPR)

RAFFAEL MASSUDA

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Roberto Andreatini**, por ter me aceitado no seu laboratório, por todo o conhecimento e olhar crítico que compartilhou comigo, por me instigar a fazer o meu melhor e começar a indagar minhas próprias perguntas científicas, meu agradecimento e admiração.

À **Ana**, minha co-orientadora e grande amiga, que chegou neste laboratório no início do meu mestrado e se tornou parte indispensável tanto do meu projeto quanto da minha vida, muito obrigada por tudo.

Ao **Thiago** e a todos os meus colegas de laboratório, muito obrigada pelo apoio, carinho, os perrengues que passamos juntos e as piadas que compartilhamos.

À **Kelin** e a **Franciele**, minhas amigas de graduação, desejo às duas tudo de bom nesses novos caminhos que vocês trilham e que a gente se encontre novamente.

Aos meus amigos de mestrado **Marcella**, **Maiara** e **Carlos**, muito obrigada pelo companheirismo e todos os momentos que vivemos juntos nestes 2 anos.

Aos **Profs. Cristina Stern, Aleksander Zampronio, Paulo Dalsenter e Helena de Assis**, e aos laboratórios de **Inflamação, Dor e Febre; Toxicologia Reprodutiva e Toxicologia Ambiental**, muito obrigada por todo o suporte, conhecimento, espaço e tempo que vocês prestaram a mim no desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Roseli Boerngen de Lacerda**, muito obrigada pela ajuda estatística.

À **Prof. Janaína Zanoveli**, minha primeira orientadora, muito obrigada pela iniciação à pesquisa.

Aos técnicos e professores da **Pós-graduação em Farmacologia**, muito obrigada por toda a ajuda, disponibilidade e paciência que vocês sempre me ofereceram de prontidão.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

Ao **Bruno**, meu melhor amigo e companheiro de vida, o mundo acadêmico é bem mais legal quando você está comigo.

Aos meus pais **Helder** e **Rosana** por tudo. À minha irmã **Natália** por ser minha alma gêmea. Sem o apoio, carinho, compreensão e conforto que vocês sempre me ofereceram, eu não teria chegado aqui.

RESUMO

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um transtorno psiquiátrico crônico caracterizado por episódios recorrentes e cíclicos de depressão e mania. O estado maníaco inclui vários e complexos sinais que incluem a hiperatividade, hiperssexualidade, baixa necessidade de sono e impulsividade. Na clínica parece haver uma influência importante da flutuação hormonal e do ciclo reprodutivo da vida da mulher bipolar na frequência e gravidade dos episódios de mania. Apesar disso, os estudos pré-clínicos com fêmeas são escassos na literatura. O objetivo deste trabalho, portanto, foi investigar o papel do sexo, ciclo estral e estradiol no comportamento tipo maníaco induzido por privação de sono REM de 24h (PSREM) em ratos Wistar. Foram avaliados os comportamentos de hiperlocomoção, o *rearing* e a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (USVs de 50-kHz), que são relacionadas a um estado de afeto positivo. Foi observado que fêmeas e machos expressam perfis diferentes de comportamentos tipo maníacos induzidos por PSREM, sendo que fêmeas apresentam mais hiperlocomoção e *rearing*, enquanto machos emitem mais USVs de 50-kHz. Além disso, observou-se que a fase do ciclo estral influencia a emissão de USVs de 50-kHz, aumentando o número de USVs em fêmeas na fase de pico hormonal, mas não o *rearing* ou a atividade locomotora. Por último, foi visto que o estradiol induz o aumento de USVs de 50-kHz, *rearing* e atividade locomotora em fêmeas ovariectomizadas. Com estes dados, observamos que há diferenças sexuais no comportamento tipo maníaco induzido por PSREM, bem como influência da flutuação hormonal, especificamente do hormônio estradiol. A análise de USVs de 50-kHz parece ser mais sensível à flutuação hormonal em fêmeas do que a hiperlocomoção e o *rearing* e parece ser, portanto, um parâmetro comportamental importante e sensível na avaliação do estado afetivo em modelo de mania. Diversos estudos que incorporam machos e fêmeas na avaliação de comportamentos relacionados à transtornos psiquiátricos puderam observar diferença de sexo. Este trabalho aumenta as evidências da literatura sobre o efeito de sexo, ciclo estral e hormônios sexuais em modelo animal e reforça a necessidade de se estudar melhor essas diferenças e o efeito destes fatores na neurobiologia de transtornos psiquiátricos.

Palavras-chave: Transtorno de humor bipolar. Mania. Modelo animal. Vocalizações ultrassônicas de 50-kHz. Diferenças de sexo. Fêmeas. Ovariectomia. Estradiol.

ABSTRACT

Bipolar Disorder (BD) is a chronic psychiatric disorder characterized by recurrent and cyclic episodes of depression and mania. The manic state includes several complex signs including hyperactivity, hypersexuality, low need for sleep, and impulsivity. In the clinic there seems to be an important influence of hormonal fluctuation and the reproductive cycle of a bipolar patient's life on the frequency and severity of manic episodes. Despite this, preclinical studies with females are scarce in the literature. The objective of this study was to investigate the role of sex, oestrous cycle and estradiol in manic type behavior induced by 24h REM sleep deprivation (REMSD) in Wistar rats. The behavior of hyperlocomotion, rearing and the emission of 50-kHz ultrasonic vocalizations (50-kHz USVs), which are related to a state of positive affect, were evaluated. It was observed that females and males express different profiles of manic behaviors induced by REMSD, and females present more hyperlocomotion and rearing, while males emit more 50-kHz USVs. In addition, it was observed that the estrous phase influences the emission of 50-kHz USVs, increasing the number of USVs in females in the peak hormonal phase, but not showing an effect on rearing or locomotor activity. Lastly, it was observed that estradiol induces an increase of 50-kHz USVs, rearing and locomotor activity in ovariectomized female rats. With these data, we observed that there are sexual differences in manic-type behavior induced by REMSD, as well as the influence of hormonal fluctuation, specifically the effect of estradiol. The analysis of 50-kHz USVs appears to be more sensitive to hormonal fluctuation in females than hyperlocomotion and rearing and therefore appears to be an important and sensitive behavioral parameter in assessing the affective state in the mania model. Other studies that have incorporated male and female animals on the evaluation of behaviors related to psychiatric disorders have observed effects of sex. This work adds to the literature of the effects of sex, oestrous cycle and sexual hormones in animal models and reinforces the need to study these differences and the influence of these factors in the neurobiology of psychiatric disorders.

Keywords: Bipolar disorder. Mania. Animal model. Ultrasonic vocalizations of 50-kHz. Sex differences. Female. Ovariectomy. Estradiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental do Experimento 1.....	23
Figura 2: Delineamento experimental do Experimento 2.....	24
Figura 3: Delineamento experimental do Experimento 3.....	24
Figura 4: Esquema e representação da cirurgia de ovariectomia bilateral.....	26
Figura 5: Aparato utilizado para a privação de sono REM (PSREM).	27
Figura 6: Diferenças entre fases do ciclo estral através do lavado vaginal	28
Figura 7: Espectograma dos subtipos de USVs de 50-kHz.....	30
Figura 8: Resultados Experimento 1.	34
Figura 9: Resultados Experimento 2.	36
Figura 10: Subtipos de USV de 50-kHz emitidos por machos e fêmeas.....	37
Figura 11: Resultados Experimento 3.	40
Figura 12: Subtipos de USV de 50-kHz emitidos por fêmeas ovariectomizadas e tratadas com estradiol.....	41

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1	A MANIA NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR.....	10
1.2	DIFERENÇAS SEXUAIS NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E A INFLUÊNCIA DA FLUTUAÇÃO HORMONAL EM MULHERES	12
1.3	ESTRADIOL.....	14
1.4	TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR.....	16
1.5	MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR	17
1.6	ANÁLISE DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ	19
2.	JUSTIFICATIVA	21
3.	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	ANIMAIS	23
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
4.3	OVARIECTOMIA BILATERAL	25
4.4	DROGAS	26
4.5	PRIVAÇÃO DE SONO REM DE 24H.....	26
4.6	DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL	27
4.7	TESTES COMPORTAMENTAIS	29
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5.	RESULTADOS	32
5.1	FÊMEAS E MACHOS EXPRESSAM PERFIS DIFERENTES DE COMPORTAMENTOS TIPO MANÍACOS INDUZIDOS POR PSREM.....	32

5.2	A FASE DO CICLO ESTRAL INFLUENCIA A EMISSÃO DE USVS DE 50-KHZ, MAS NÃO O REARING OU A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO MODELO DE PSREM.....	34
5.3	O ESTRADIOL INDUZ O AUMENTO DE USVS DE 50-KHZ, REARING E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM FÊMEAS OVX.....	37
6.	DISCUSSÃO.....	42
7.	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO 1- Efeito do modelo de PSREM de 24h sobre os comportamentos tipo maníacos e do tratamento com lítio em machos e fêmeas.....	68
	ANEXO 2- Efeito do modelo de PSREM de 24h sobre os comportamentos tipo maníacos e do tratamento com lítio em fêmeas OVX.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 A MANIA NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

O Transtorno de Humor Bipolar (THB) é um distúrbio psiquiátrico crônico, associado a problemas pessoais, familiares e até sociais, caracterizado por episódios recorrentes e cíclicos de depressão e mania. O transtorno bipolar (THB) é a perturbação episódica do humor em depressão ou elevação. O THB é subclassificado em THB do tipo I, definido pelo episódio maníaco que muitas vezes exige internação hospitalar, e THB do tipo II, definido por um histórico de depressão maior e hipomania, mas sem histórico de mania (GOODWIN, 2016). A prevalência deste transtorno é de aproximadamente 1% da população, podendo chegar à 4% se uma definição mais ampla do espectro do transtorno for utilizada (HARRISON et al., 2018). O THB é um transtorno complexo e multifatorial, com um importante fator genético levando a um alto risco de hereditariedade, bem como fatores ambientais que podem desencadear seu início (MACHADO-VIEIRA et al., 2014). Seu início pode ser desencadeado por eventos como trauma na infância, eventos estressantes, abuso de álcool e outras drogas (GOODWIN, 2016). A partir disso surgem os primeiros sintomas da doença que se torna crônica, ciclando entre episódios de depressão, eutímia e mania. Comorbidades com transtornos de ansiedade e abuso de drogas são comuns e a taxa de suicídios entre pacientes com THB é de 10%. Além disso, há um aumento de mortalidade por causas naturais, principalmente devido aos riscos tomados por pacientes em estado maníaco (HARRISON et al., 2018). Somando tudo isso ao seu início precoce e cronicidade dos sintomas ao longo da vida do paciente (MERIKANGAS et al., 2011), tornam o THB a sexta principal causa de invalidez em todo o mundo (ASHOK et al., 2017).

O episódio maníaco é caracterizado principalmente por um período de alteração no humor que se torna persistentemente elevado (ou irritável), expansivo e energético por pelo menos uma semana. Além disso, o paciente apresenta sinais de baixa necessidade de sono, discurso exacerbado, pensamento acelerado com fuga de idéias, dificuldade em manter a atenção e concluir tarefas, sentimento de grandiosidade, bem como hiperssexualidade e aumento de impulsividade relacionado a situações prazerosas mas com grande potencial para prejuízos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; GRANDE et al., 2016). Para ocorrer o

diagnóstico de um episódio de mania, o paciente precisa apresentar o sinal de humor elevado e expansivo (e/ou irritável), além de mais algum outro destes sinais, que mais comumente são a hiperatividade (em 90% dos casos), menor necessidade de sono (83%), verborria (89%), discurso acelerado (88%) e hipersexualidade (51%) (GOODWIN et al., 2007).

Apesar de fatores genéticos serem de grande importância na etiologia deste transtorno, as alterações bioquímicas envolvidas na predisposição e patofisiologia do THB ainda não são completamente elucidadas (MANJI et al., 2003). A teoria dopaminérgica ainda é uma das principais, e o papel da dopamina em transtornos de humor tem sido evidenciado por diversos estudos clínicos e pré-clínicos diferentes. Estudos mostram que em situações de aumento de dopamina levam à um fenótipo tipo maníaco, quer seja por bloqueio de recaptção de dopamina, estimulação de receptores dopaminérgicos ou por aumento de liberação de dopamina. Psicoestimulantes como a anfetamina levam à comportamentos tipo maníacos em pessoas saudáveis (SILVERSTONE, 1985; JACOBS; SILVERSTONE, 1986; ASGHAR et al., 2003) e o tratamento com agonistas dopaminérgicos como levodopa em pacientes parkinsonianos podem levar à esses mesmos sintomas (KO et al., 1981; HARSCH et al., 1985). Além disso, estudos com animais do tipo *knockout* para o transportador de dopamina (DAT) mostraram que eles apresentavam comportamento de risco aumentado quando comparados com animais selvagens (YOUNG et al., 2011). Já situações de queda de dopamina como por exemplo lesão de áreas dopaminérgicas, como a área tegmental ventral ou *substantia nigra*, leva a comportamentos tipo depressivos como o desamparo aprendido e imobilidade no teste do nado forçado (WINTER et al., 2007; SANTIAGO et al., 2015). Porém, muito ainda precisa ser elucidado sobre o que muda em questão de síntese e liberação de dopamina, densidade, disponibilidade e funcionalidade de receptores D1, D2/D3 na membrana sináptica e com os transportadores de dopamina entre a mania e a depressão, para só assim se entender melhor como as vias de sinalização dopaminérgica operam no THB.

1.2 DIFERENÇAS SEXUAIS NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E A INFLUÊNCIA DA FLUTUAÇÃO HORMONAL EM MULHERES

Embora não haja diferença na prevalência deste transtorno entre homens e mulheres, há algumas diferenças relevantes na sintomatologia e curso da doença que aparentam ser dependentes de sexo. Mulheres apresentam maior prevalência de THB do tipo II, que é caracterizada por episódios de hipomania e depressão e também parecem apresentar mais episódios de ciclotimia, que são recorrentes variações de humor, variando entre hipomania e distímia ou depressão (BENAZZI, 1999; DIFLORIO; JONES, 2010). Além disso, o THB em mulheres normalmente apresenta um quadro de comorbidades diferente do que em homens, tendo maior incidência de distúrbios da tireoide, enxaquecas, obesidade, bulimia e transtornos de ansiedade, bem como estresse pós-traumático (ARNOLD, 2003; BALDASSANO et al., 2005; PARIAL, 2015). Enquanto fatores como prevalência, idade de início e resposta ao tratamento não aparentam demonstrar influência importante de sexo, há fatores específicos do sexo feminino, como a maior incidência na pré-menopausa (FREY; DIAS, 2014). Portanto, a relação entre os hormônios sexuais e os aspectos psicopatológicos do transtorno bipolar em mulheres, ser relevante e deve ser melhor estudada

Um fator que parece ser de grande relevância para o prognóstico da doença é a influência do ciclo reprodutivo em mulheres que sofrem deste transtorno (DIFLORIO; JONES, 2010). Evidências clínicas já mostravam que quedas abruptas de estrogênio podem levar à episódios depressivos, sendo que (DALTON, 1959) observou que de 276 mulheres admitidas em hospitais psiquiátricos, quase metade se encontrava no período pré-menstrual e que o risco de suicídio dentre essas mulheres era maior nesses dias. Diferentes estudos clínicos reportaram aumento de episódios de flutuação de humor relacionado ao ciclo reprodutivo de mulheres bipolares, como na pré-menstruação (CIRILLO et al., 2012; TEATERO et al., 2014), pós-parto (KUMAR et al., 2003; THOMSON; SHARMA, 2017; LEWIS et al., 2018) e menopausa (YOUNG et al., 1997; PERICH et al., 2017).

O transtorno disfórico pré-menstrual que é uma forma grave da síndrome pré-menstrual, por exemplo, parece ter uma prevalência maior em mulheres com THB do que em mulheres na população em geral (WITTCHEN et al., 2002; FORNARO; PERUGI, 2010), apesar de outros estudos não observarem uma correlação entre a

fase do ciclo menstrual e exacerbações de humor (SHIVAKUMAR et al., 2008; SIT et al., 2011). Mulheres que tem THB são mais propensas a apresentarem irregularidades em seus ciclos menstruais (RASGON et al., 2003, 2005) e o tratamento com valproato de sódio parece contribuir para o agravamento dessas irregularidades (JOFFE; COHEN; SUPPES; MCLAUGHLIN; et al., 2006; JOFFE; COHEN; SUPPES; HWANG; et al., 2006). A relação entre a patofisiologia do transtorno disfórico pré-menstrual e de transtornos de humor ainda não é completamente elucidada e alguns estudos demonstraram que não parece haver alterações anormais de níveis hormonais em mulheres que sofrem de deste transtorno pré-menstrual (LEIBENLUFT et al., 1999). O que parece haver então, é um subgrupo de mulheres que sofrem de transtornos de humor que são mais vulneráveis que as outras a flutuações hormonais, o que pode desencadear episódios de transtorno disfórico pré-menstrual nessas pacientes (DIFLORIO; JONES, 2010; SYAN et al., 2018).

Apesar da gravidez em si não parecer ser um agravante para transtornos de humor, o pós-parto é um período de alto-risco para o início de sintomas ou recorrência de episódios de depressão e mania (MUNK-OLSEN T et al., 2006; VIGUERA et al., 2011), sendo que o transtorno bipolar do tipo II, principalmente, parece conferir um grande risco para desenvolvimento de depressão pós-parto (MANDELLI et al., 2016). O diagnóstico de THB é um grande preditor de readmissão psiquiátrica no primeiro mês do pós-parto (MUNK-OLSEN et al., 2009). Um outro fator que parece ser de suma importância para desencadear episódios maníacos no pós-parto é a privação de sono (LEWIS et al., 2018) comumente sofrida por mulheres principalmente nas primeiras 2 semanas do puerpério. Assim como no transtorno disfórico pré-menstrual, mulheres que sofrem com transtornos de humor no pós-parto não parecem apresentar anormalidades em níveis hormonais durante esses episódios (WIECK, 1989; WISNER; STOWE, 1997), o que reafirma a idéia que há subgrupos de mulheres que são mais vulneráveis que outras a mudanças hormonais drásticas.

Quanto ao período de menopausa, há poucas evidências de que esse estágio do ciclo reprodutivo feminino seja de alto risco para o diagnóstico de um novo transtorno de humor (PAYNE, 2003). Porém a peri e a pós-menopausa tem sido associados com episódios de flutuação de humor em mulheres já diagnosticadas (KESSLER et al., 1993; MARSH et al., 2015). Episódios de depressão e mania são observados em 20 a 50% das mulheres bipolares transicionando pela menopausa

(BLEHAR et al., 1998; MARSH et al., 2009). Após esse período de transição hormonal, a taxa de episódios de flutuação de humor parece cair (KESSLER et al., 1993), indicando mais uma vez que não seria a deficiência de estrógenos, mas sim a mudança drástica de seus níveis em subgrupos de mulheres mais sensíveis à flutuações hormonais o gatilho para episódios de depressão e mania (PAYNE, 2003; MEINHARD et al., 2014).

1.3 ESTRADIOL

O estudo de hormônios sexuais envolve não apenas os hormônios e suas vias de ação, mas também sua flutuação ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas e mulheres. O ciclo estral em roedores fêmeas é um espectro de constante mudança de níveis hormonais, que parte do diestro com baixos níveis de estradiol e progesterona, lentamente aumentando seus níveis de estradiol até que em pró-estro se tem o pico deste hormônio. A partir deste momento há um aumento de progesterona concomitante à queda de estradiol em estro, até que ambos os hormônios retornem à níveis baixos no diestro (XIAO; BECKER, 1994).

Além de participar da regulação do ciclo menstrual e preparar o útero para a gravidez, o hormônio estradiol também desenvolve ampla ação no sistema nervoso central (MEINHARD et al., 2014). Receptores de estrogênio são encontrados em áreas do cérebro envolvidas com a regulação do humor, incluindo o hipotálamo, hipocampo, amígdala, e córtex pré-frontal (MCEWEN; ALVES, 1999; MCEWEN, 2002). O estradiol altera o funcionamento de vários neurotransmissores, modulando por exemplo o sistema serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico e colinérgico (LUINE, 1985; MCEWEN; ALVES, 1999; MCEWEN, 2002; SELLIX et al., 2004). A ação do estradiol se dá no cérebro através de sua ação em receptores nucleares ER- α e ER- β (KOVATS, 2015). Na via clássica da ação do estrogênio, ele se liga ao seu receptor (ER) induzindo mudanças conformacionais no receptor que promovem a dimerização e a interação deste com outras moléculas. O complexo ligante-receptor se liga com alta afinidade a elementos de resposta ao estrogênio (EREs) nas regiões reguladoras dos genes alvo para ativar ou reprimir a expressão gênica (GLASS, 1994; TSAI; O'MALLEY, 1994; MCKENNA et al., 1999; SMITH; O'MALLEY, 2004).

Mas sabe-se agora que o estradiol tem ações além daquelas estabelecidas em sua via clássica. O estradiol age por pelo menos três outras vias não clássicas, sendo elas: a sinalização de ER ligante-independente, na qual a ativação do gene ocorre através de vias de segundos mensageiros que alteram a atividade de quinases e fosfatases intracelulares, resultando na alteração da fosforilação dos ER (WEIGEL; ZHANG, 1998); através de sinalização genômica independente do ERE, na qual o ER regula genes independente da ligação direta do DNA via interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição; e através de efeitos rápidos e não genômicos via ER associados à membrana (WEBB et al., 1995; KUSHNER et al., 2000; SAFE, 2001; JAKACKA et al., 2002). Estes receptores de membrana parecem mediar muitos dos efeitos rápidos do estradiol (TORAN-ALLERAND, 2004) como por exemplo a mobilização induzida por estrogênio do cálcio intracelular, a estimulação da atividade da adenilato ciclase e a produção de AMPc (ARONICA et al., 1994; IMPROTA-BREARS et al., 1999).

ER- α e ER- β são complementares, mas não são redundantes e são geneticamente e funcionalmente distintos. Enquanto o ER- α parece ser importante para a regulação da função neuroendócrina no SNC, o ER- β parece estar mais relacionado ao comportamento e respostas hormonais ao estresse (WEISER et al., 2008). Dentre os estrógenos, o principal e mais potente é o 17 β -estradiol (HORST, TER et al., 2009). Este hormônio parece atuar indiretamente como agonista dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, por diminuir a atividade da MAO e também diminuir a sensibilidade de receptores dopaminérgicos D2 (PAYNE, 2003).

O 17 β -estradiol é também um fator de crescimento neuronal e, como as neurotrofinas, influencia a neurogênese, a diferenciação neuronal e a sobrevivência neuronal de seus alvos ao longo da vida (GARCIA-SEGURA et al., 2001; MCEWEN, 2002; BEHL, 2002; WANG et al., 2002). Foi observado também que o 17 β -estradiol tem efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo (IRWIN et al., 2008; NUMAKAWA et al., 2011). Este efeito antioxidante também é encontrado em estabilizadores de humor e drogas com efeito antimaníaco como o lítio e valproato de sódio (FREY et al., 2006; ANDREAZZA et al., 2008). Além disso, vários estudos já reportaram a ação do estradiol sobre a PKC, enzima envolvida no THB, levando a sua ativação (KOW et al., 1994; KELLY et al., 1999; DEWING et al., 2008) e estudos de caso mostraram que ele é capaz de induzir episódios maníacos em mulheres bipolares na menopausa (OPPENHEIM, 1984; CHOUINARD et al., 1987; YOUNG et al., 1997). Apesar dessas

evidências estarem presentes na clínica, há poucos estudos pré-clínicos que foquem no THB em fêmeas e que levem em consideração suas mudanças hormonais.

1.4 TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

O tratamento do THB é complexo devido à sua característica cíclica entre polos opostos do humor. O estabilizador de humor lítio tem sido utilizado como principal tratamento para o THB por muito tempo, além do valproato de sódio, ambos utilizados na profilaxia e manutenção da doença (HARRISON et al., 2018). Porém, até hoje seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados. Já se sabe que o lítio é capaz de modular vias de sinalização dopaminérgicas (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; ASHOK et al., 2017) ligando-se a vários pontos diferentes nessa cascata de sinalização. Um dos mecanismos de ação do lítio é inibir a inositol monofosfatase (IMPase) e a inositol polifosfatase (IPPase), levando a uma diminuição da reciclagem de inositol a partir de fosfatos de inositol e síntese *de novo* de inositol (WILLIAMS et al., 2002). Ao impedir essa reciclagem, a inibição direta da IMPase e da IPPase pelo lítio reduz os níveis de inositol e modula as vias de ativação do fosfatidilinositol, que por sua vez, através desta cascata de sinalização secundária, modula a ação de diversos neurotransmissores (CAN et al., 2014). Estudos pré-clínicos mostram que o lítio é um inibidor direto da GSK-3, e indireto através de mecanismos que envolvem ativação da Akt e interrupção de um complexo de sinalização formado por β -arrestina 2/PP2A, complexo esse que medeia parte da sinalização de receptor D2 (CHALECKA-FRANASZEK; CHUANG, 1999; ZHANG et al., 2003; BEAULIEU et al., 2007). Além disso, o lítio é capaz de inibir a atividade da enzima PKC, que faz parte da via de sinalização interna de receptores dopaminérgicos (MALHI et al., 2013) e é uma das proteínas quinases que regulam a fosforilação de GSK-3 (GOODE et al., 1992). Estudos com microdiálise mostram também níveis reduzidos de dopamina extracelular em animais tratados com lítio (GAMBARANA et al., 1999; FERRIE et al., 2008).

Novos antipsicóticos atípicos como a olanzapina, fármaco com afinidade por receptores D1-D5, 5HT₂, muscarínicos, alfa-adrenérgicos e histaminérgicos (CALLAGHAN et al., 1999; KOMOSSA et al., 2010); e a quetiapina, um fármaco com alta afinidade por receptores histaminérgicos, alfa-adrenérgicos, receptores D1, D2,

5-HT1A e principalmente por 5-HT2 (DEV; RANIWALLA, 2000; HABIBI et al., 2017) tem mostrado efeitos antimaníacos e antidepressivos, tanto na clínica quanto em modelo animal (YOUNG et al., 2014; KETTER et al., 2016). Apesar disso, muitos pacientes com THB ainda sofrem com o tratamento, seja por resistência, por efeitos colaterais e/ou riscos de toxicidade (GITLIN, 2006; HUI POON et al., 2015). Portanto, é necessário compreender melhor a fisiopatologia da doença, bem como os mecanismos de ação de fármacos já utilizados na clínica, como o lítio, para aprimorar o uso dos tratamentos já utilizados, bem como desenvolver novas terapias.

1.5 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

O tratamento do THB, que em grande parte é feito por estabilizadores de humor como o lítio, tem aderência limitada dos pacientes e eficácia terapêutica parcial (GOODWIN; GEDDES, 2003; GITLIN, 2006; CAN et al., 2014). De fato, desde o início da utilização do lítio no tratamento do THB, nenhum medicamento foi desenvolvido especificamente para o tratamento deste transtorno (MACHADO-VIEIRA et al., 2014) mas sim, utiliza-se de fármacos primariamente destinados para outras doenças como anticonvulsivantes e antipsicóticos.

Apesar da demanda por novos fármacos, a pesquisa sobre o transtorno de humor bipolar e a compreensão da sua fisiopatologia são dificultadas pela falta de modelos animais apropriados. O THB, por alternar episódios de mania, depressão, eutímia e estados mistos, dificulta o desenvolvimento de um modelo animal adequado que apresente esta característica cíclica (MACHADO-VIEIRA et al., 2004). Portanto, a depressão e a mania acabam sendo estudadas separadamente utilizando modelos animais diferentes para cada polo do humor. Este trabalho foca em estudar o estado maníaco do THB e, conseqüentemente, os modelos propostos a este estado.

Modelos animais devem apresentar validade de face (mimetizar os sintomas da doença), de constructo (mimetizar aspectos da neurobiologia) e preditiva (discriminar entre drogas eficazes e ineficazes na clínica) (EINAT et al., 2003; MACHADO-VIEIRA et al., 2004). Poucos são os modelos de mania que conseguem se adequar a estes 3 critérios (YOUNG et al., 2011). Além disso, a avaliação comportamental deste estado se dá em boa parte dos estudos através apenas da

atividade locomotora, o que não é um parâmetro específico da mania, sendo avaliada também em modelos de esquizofrenia e depressão. Portanto, existe a necessidade de agregar outros parâmetros comportamentais na avaliação do comportamento tipo maníaco.

A privação de sono REM (PSREM), é um modelo ambiental que leva a uma gama de alterações comportamentais semelhantes à um episódio maníaco e relevante à clínica, já que a interrupção do sono é um dos principais sinais do início do quadro maníaco (YOUNG et al., 2011). Privação de sono pode exacerbar episódios maníacos e também levar a viradas maníacas em pacientes com THB (WEHR et al., 1982; BARBINI et al., 1996). Além disso, a PSREM pode produzir uma resposta aguda antidepressiva em até 80% dos pacientes bipolares. A PSREM foi proposta como um modelo de mania por Gessa em 1995. Neste modelo, um rato ou camundongo é posicionado em uma plataforma pequena (3-7cm), cercado por água por um período prolongado de tempo, período este em que o animal fica impossibilitado de dormir (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995). Relaxamento muscular associado com o sono REM leva o animal a cair na água e acordar. O aparato faz então com que o animal fique privado de atingir este estágio de sono pelo período determinado pelo pesquisador. Quando estes roedores são colocados de volta em suas caixas-moradia após o período de privação de sono, eles apresentam uma série de comportamentos do tipo maníaco que incluem: insônia, hiperatividade, agressividade, hiperssexualidade e impulsividade (MOORE et al., 1979; GESSA, G L et al., 1995; BENEDETTI et al., 2008), alterações estas que são antagonizadas pela ação do lítio (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995). Esse aumento de atividade ocorre num período de 30-40 minutos imediatamente após o término da privação de sono (EINAT, 2007; BENEDETTI et al., 2008).

O modelo de mania por PSREM apresenta validade preditiva, já que a administração de fármacos com atividade antimaniaca como o lítio, ácido valpróico, haloperidol e aripiprazol são capazes de atenuar seus efeitos comportamentais (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995; ABRIAL et al., 2015; STRECK et al., 2015; NOGOCEKE et al., 2016). Além disso, este modelo é capaz de alterar a neurogênese hipocampal, sintoma este observado em pacientes com THB, levando a um aumento (JUNEK et al., 2010) ou diminuição (JUNEK et al., 2010; ABRIAL et al., 2015) dessa proliferação, dependendo do tempo de privação. Por último, este modelo é capaz de levar a um aumento da atividade da enzima PKC, enzima envolvida na sinalização

dopaminérgica (SZABO et al., 2009; ABRIAL et al., 2015) e o tratamento com inibidores da atividade da PKC, tal como o tamoxifeno, levam a reversão deste efeito, assim como diminuição do comportamento tipo maníaco (ARMANI et al., 2012; ABRIAL et al., 2015). Sendo assim, foi escolhido este modelo para a realização de uma avaliação da diferença sexual entre machos e fêmeas e influência hormonal em comportamentos tipo maníacos.

1.6 ANÁLISE DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ

Einat (EINAT, 2007), dentre outros, propôs que uma bateria de testes comportamentais deveria ser utilizada para se observar um espectro mais robusto e correlacionável com a clínica do que se mede em modelo animal. Uma abordagem alternativa seria avaliar diferentes parâmetros em sequência em um mesmo animal, como realizado por Abrial e colaboradores (ABRIAL et al., 2015), em que foi observado locomoção, comportamento sexual e latência de sono simultaneamente. Neste trabalho propomos avaliar simultaneamente parâmetros locomotores (locomoção e *rearing*) e a emissão de vocalizações ultrassônicas (USV) de 50-kHz.

Alguns animais, dentre eles os ratos, são capazes de emitir USVs em determinadas situações que parecem estar relacionadas à comunicação social destes animais (Wöhr e Schwarting, 2013; Brudzynski, 2015). Estas vocalizações têm sido classificadas em duas categorias básicas: USVs de 22 kHz, que ocorrem em situações aversivas (Van der Poel et al., 1989; Wöhr et al., 2005), provavelmente expressando um estado afetivo negativo e servindo uma função comunicativa de alarme; e as USVs de 50-kHz que ocorrem em situações apetitivas, incluindo *rough and tumble play* (Knutson et al., 1998; Lukas e Wöhr 2015) e cócegas (Panksepp e Burgdorf 2000; Wöhr et al., 2009) e, portanto, parecem expressar um estado afetivo positivo (Burgdorf et al., 2011).

A emissão de USV de 50-kHz pode ser induzida farmacologicamente por administração de anfetamina sistêmica ou diretamente no núcleo accumbens (Burgdorf et al., 2007; Burgdorf et al., 2011; Wöhr e Schwarting 2013; Rippberger et al., 2015). Além disso, fármacos utilizados na clínica no tratamento de episódios de mania (antipsicóticos e lítio) são capazes de bloquear o aumento de USV de 50-kHz induzido por psicoestimulantes em modelo animal de mania (Pereira et al., 2014;

Wendler et al., 2016). Diferentes modelos animais de indução de comportamento tipo maníaco parecem levar a perfis de USV diferentes (Wendler et al., 2016) mesmo havendo hiperlocomoção em ambos, sugerindo que diferentes estados afetivos são induzidos nestes modelos animais de mania e que a análise de mais de um parâmetro comportamental, como as USVs de 50-kHz, seria capaz de captar essas diferenças.

As vias dopaminérgicas da área tegmental ventral (VTA) para o núcleo accumbens e córtex pré-frontal (PFC) parecem estar hiperativadas em pacientes maníacos (Ashok et al., 2017) e a hiperatividade dopaminérgica nesta via tem sido observada tanto em comportamentos tipo maníacos em modelos animais (Miranda et al., 2017) quanto na indução e aumento de emissão de USVs de 50-kHz (Burgdorf et al., 2007; Scardochio et al., 2015). As USVs de 50-kHz, portanto, parecem mapear um parâmetro comportamental em ratos relacionado ao afeto positivo, sendo, portanto, uma avaliação interessante a se adicionar à hiperlocomoção em modelos animais de mania.

2. JUSTIFICATIVA

O emprego de fêmeas e machos na pesquisa pré-clínica em neurociências, bem como a avaliação da influência hormonal nos comportamentos observados em modelo animal são pouco estudados. No caso do estudo pré-clínico do THB não é diferente. Na clínica é possível observar que as flutuações hormonais ao longo da vida da mulher podem estar associadas a flutuações também de humor, principalmente em mulheres com transtornos de humor e vulneráveis ao efeito dessas flutuações hormonais. Apesar de já terem sido observadas algumas relações do estradiol com dopamina e sinalizadores da via dopaminérgica como a PKC, a transposição disso para o comportamento ainda é vaga. Portanto, se faz necessário investigar melhor o efeito do sexo em modelo animal de mania, o efeito da ciclagem hormonal no comportamento das fêmeas e o papel do estradiol na manutenção ou alteração comportamental em modelo animal.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do sexo, ciclo estral e estradiol em diferentes parâmetros comportamentais de ratos submetidos ao modelo de mania induzida por PSREM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se o modelo de mania por PSREM induz comportamentos tipo maníacos que podem ser revertidos pela administração do antimaníaco lítio,

Avaliar as possíveis diferenças comportamentais dependentes de (1) sexo, (2) ciclo estral, ou (3) de estradiol no modelo de mania induzida pela PSREM de 24h nos parâmetros comportamentais de:

- Atividade locomotora;
- Comportamento exploratório (*rearing*);
- Vocalizações ultrassônicas apetitivas de 50-kHz (USV);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 209 ratos Wistar machos e fêmeas de 2-3 meses de idade, provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em caixas plásticas moradia (60x25x25 cm), 4 animais por caixa, sob temperatura controlada (22 ± 3 °C), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética sob o CEUA #982.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos cirúrgicos, tratamentos e testes comportamentais foram realizados conforme delineamento experimental abaixo:

Experimento 1: Avaliação da diferença sexual entre machos e fêmeas nos comportamentos de atividade locomotora, exploratória e emissão de USVs de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono REM de 24h

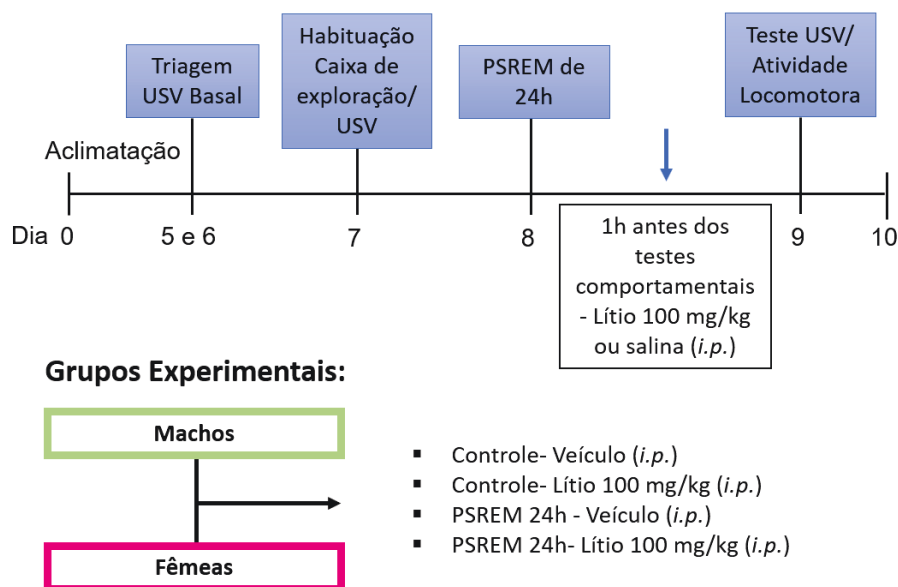


Figura 1: Delineamento experimental utilizado para o experimento 1.

Experimento 2: Avaliação da influência da fase do ciclo estral em fêmeas nos comportamentos de atividade locomotora, exploratória e emissão de USVs de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono REM de 24h

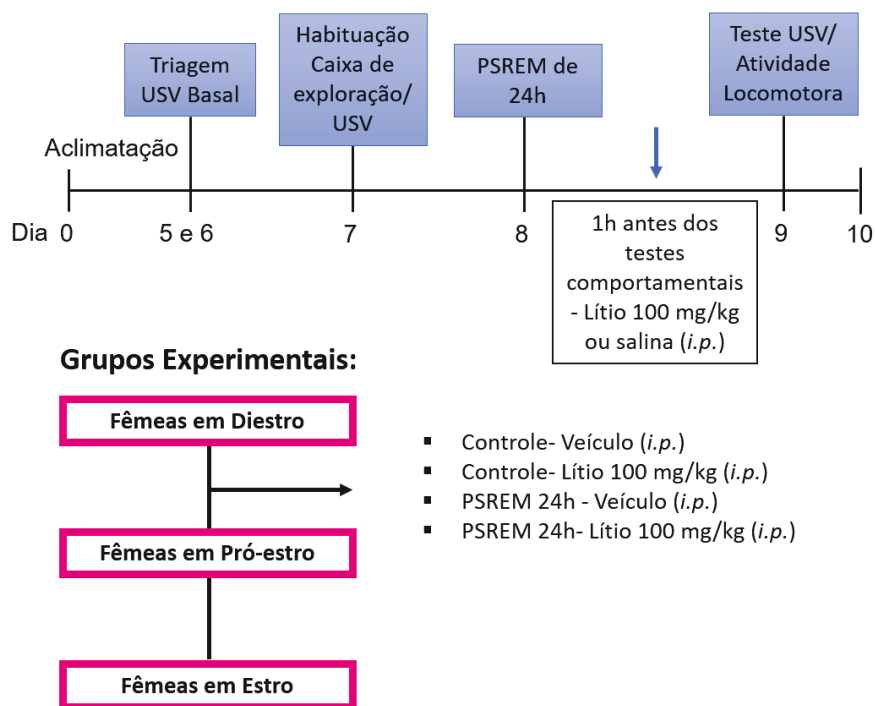


Figura 2: Delineamento experimental utilizado para o experimento 2.

Experimento 3: Avaliação da influência da ausência de hormônios sexuais em fêmeas OVX e efeito da reposição aguda com estradiol sobre os comportamentos de atividade locomotora, exploratória e emissão de USVs de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono REM de 24h

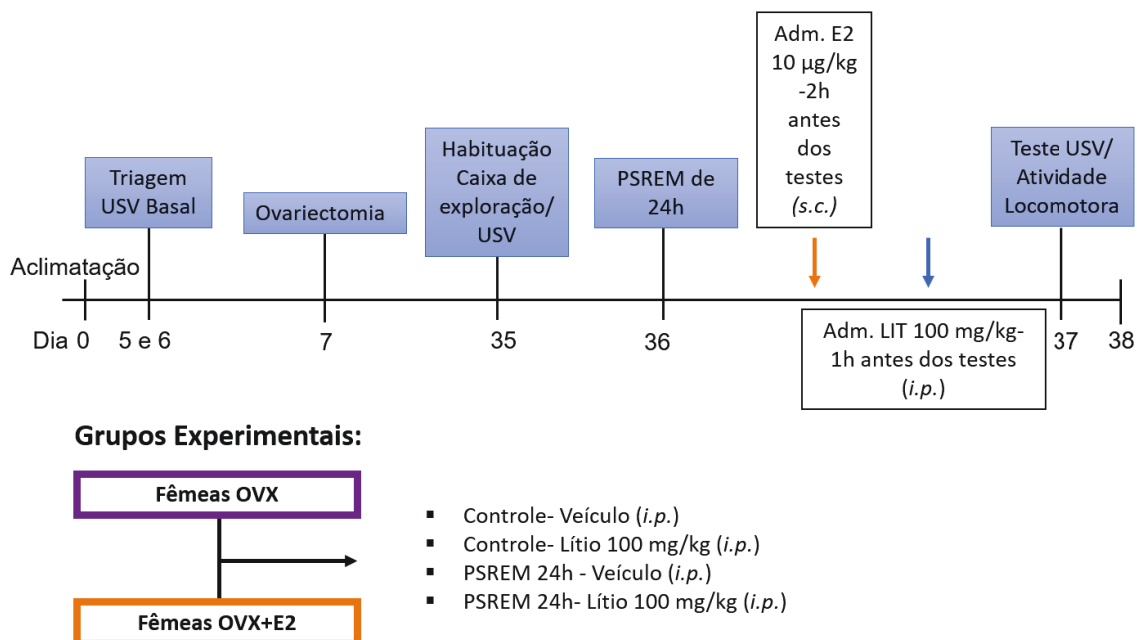


Figura 3: Delineamento experimental utilizado para o experimento comportamental 3.

4.3 OVARIECTOMIA BILATERAL

Aos três meses de idade, as ratas submetidas a ovariectomia foram anestesiadas com ketamina/xilazina (33/6,5 mg/Kg, *i.p.*) e, imediatamente, receberam uma dose oral de analgésico ibuprofeno na dose de 2,5 mg/100 g de massa corporal. Logo após, foi realizada a tricotomia e subsequente esterilização com álcool 70% ao redor da região da incisão. As ratas foram, então, posicionadas na mesa de cirurgia em decúbito dorsal, e uma incisão foi realizada na região dorsolateral, nos dois lados, aproximadamente 1 cm abaixo da última costela. Para remoção do ovário, inicialmente as tubas uterinas foram suturadas com linha reabsorvível e, em seguida, foram removidos os ovários e a gordura periovariana. Por fim, suturou-se o músculo com linha reabsorvível e, logo após, a pele com linha de nylon.

Na cirurgia SHAM, as fêmeas tiveram sua cavidade abdominal aberta, mas as tubas e ovários não foram ligados (SILVA MOREIRA, DA et al., 2016). Para o pós-cirúrgico, todos os animais receberam uma dose de 7.500 un/100 g de massa corporal de penicilina (s.c). Um reforço de analgésico (ibuprofeno na dose supracitada) foi realizado nos períodos de 12, 24 e 36 horas após o término da cirurgia. Todos os animais passaram por um período de recuperação e de queda hormonal de 4 semanas para que essas fêmeas estivessem bem recuperadas e com níveis hormonais baixos antes do início dos testes comportamentais (BENMANSOUR et al., 2009).

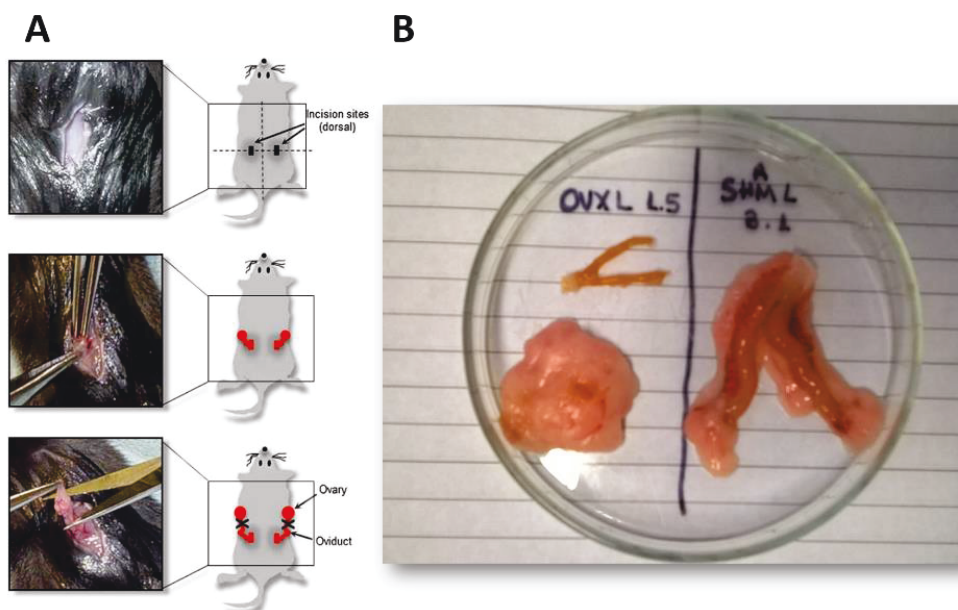


Figura 4: Ilustração e esquema do processo de cirurgia bilateral (A) para remoção dos ovários (figura adaptada Benmansour, 2009) e foto (B) de demonstração do útero atrofiado típico de fêmea sem a presença de hormônios sexuais após 1 mês da ovariectomia (à esquerda) assim como o aumento de gordura abdominal, ambos em relação a uma fêmea SHAM controle (à direita) (Fonte: o autor).

4.4 DROGAS

Carbonato de lítio (LIT) (Eurofarma- Itapevi, SP-Brasil) – 100 mg/kg, dissolvido em salina com Tween 80% (1% vol/vol) e ajustado ao pH de 7.4 por adição de 2N de HCl, administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) 1 hora antes dos testes comportamentais (WENDLER et al., 2016).

17 β -estradiol (E2) (Sigma, EUA) - 10 μ g/kg dissolvido em óleo de canola, administrado por via subcutânea (*s.c.*) 2 horas antes dos testes comportamentais (Osterlund et al., 1998). A dose utilizada foi uma que se usa para manutenção artificial do ciclo estral, comparável aos níveis normais de estradiol no pico hormonal do ciclo estral (GERRITS et al., 2005; HORST, TER et al., 2009)

4.5 PRIVAÇÃO DE SONO REM DE 24H

Para a indução do comportamento tipo maníaco foi utilizado o modelo de mania por privação de sono REM (PSREM). Cada animal privado de sono foi colocado em uma plataforma cilíndrica de 6,5 cm de diâmetro dentro de um latão de metal (23×23×30 cm) cercado por água a 1 cm abaixo da plataforma (TUFIK et al., 2009) por um período de 24h.

No início de cada episódio de sono REM, o animal sofre de uma perda do tônus muscular e cai na água, sendo assim despertado. Quando plataformas deste tamanho são utilizadas, o sono REM é completamente suprimido (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995; YOUNG et al., 2011). Durante o protocolo de PSREM a sala experimental com os latões de privação de sono REM foi mantida em condições controladas (22 ± 2 °C, 12 h ciclo claro / escuro, luzes iniciando as 07:00 a.m.). O grupo controle foi mantido isolado em caixas moradia pelo mesmo período em que os animais PSREM foram mantidos privados de sono. Alimento e água eram fornecidos *ad libitum* para todos os animais.

No final do período de privação de sono, tem sido observado uma hiperlocomção e agitação destes animais (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995) por um período de 30-40 minutos. Portanto, os testes comportamentais foram realizados imediatamente após o término da PSREM.



Figura 5: Foto dos latões de privação de sono REM utilizados neste trabalho (Fonte: o autor).

4.6 DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

A determinação do ciclo estral das fêmeas foi realizada imediatamente após o término dos testes comportamentais com o objetivo de evitar a influência do estresse da manipulação para a coleta sobre o comportamento. Os esfregaços vaginais ocorreram com o auxílio de uma haste de algodão úmido e o material era depositado sobre uma lâmina e avaliado à fresco em microscópio. A classificação do ciclo foi feita determinando a presença predominante de células nucleadas (pró-estro), células cornificadas (estro) ou leucócitos (diestro) (BENMANSOUR et al., 2009), sendo que fêmeas em metaestro, que apresentam todos esses tipos de células ao mesmo

tempo, não foram consideradas neste experimento por serem raramente encontradas. A partir dessa classificação as fêmeas foram agrupadas *a posteriori* nos seus grupos experimentais.

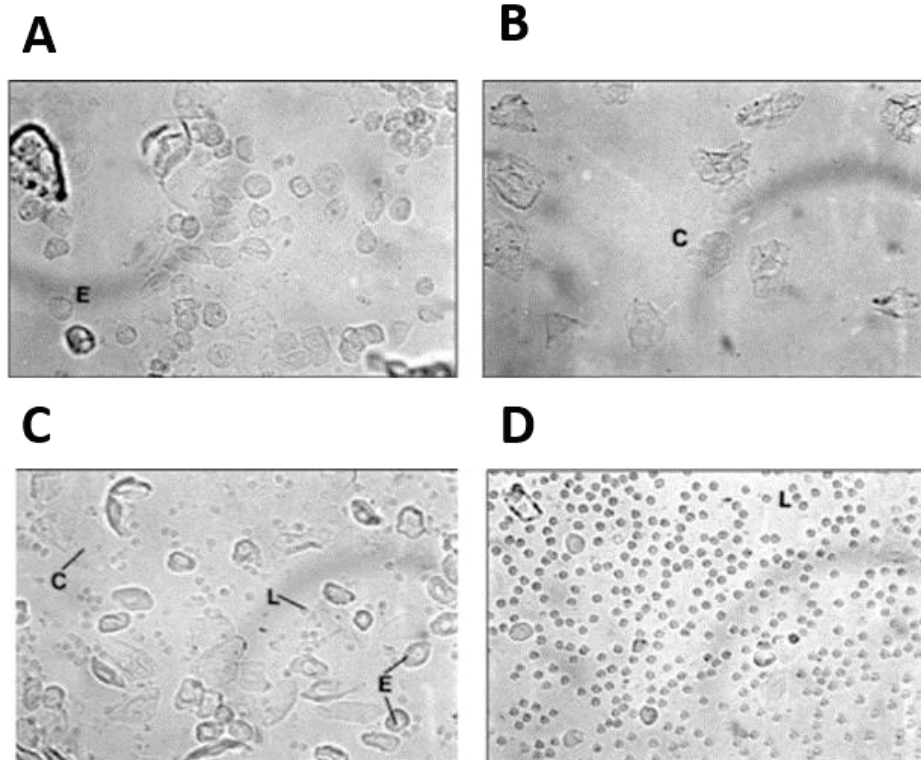
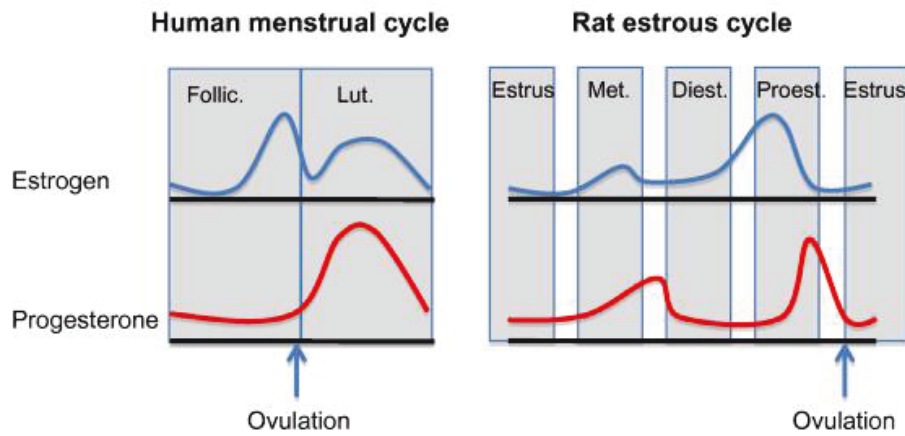


Figura 6: Ilustração esquemática da flutuação hormonal que ocorre no ciclo menstrual em mulheres e ciclo estral em roedoras (figura adaptada Lebron-Milad, 2012). Foto de lavados vaginais observados em microscópio no aumento de 40x (imagem adaptada Marcondes, 2002) para a avaliação do ciclo estral avaliando a predominância dos tipos de células presentes. (A) pró-estro com células epiteliais nucleadas; (B) estro com células epiteliais cornificadas; (C) metaestro com diversos tipos de célula; (D) diestro com abundância de leucócitos.

4.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

Análise de Vocalizações Ultrassônicas de 50-kHz (USV)

Os animais passaram por cinco dias de aclimação ao biotério e habituação ao experimentador antes do início dos procedimentos de teste. Posteriormente, os animais passaram por uma primeira exposição ao teste de vocalização, denominado de triagem basal de vocalizações ultrassônicas espontâneas, a partir da qual foi feita uma randomização estratificada destes, de acordo com a média de vocalização de cada animal. Dentro de um grupo de animais, normalmente existem aqueles que vocalizam pouco (aproximadamente 20 vocalizações por minuto), e os que vocalizam muito (acima de 70 vocalizações por minuto). Estes animais então foram designados aos seus grupos experimentais.

Para a gravação das vocalizações um microfone apropriado para captura de vocalização ultrassônica, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) é colocado acima da caixa de atividade à 45 cm do chão da caixa para uma melhor captura acústica. Este microfone é sensível a frequências entre 15-180 kHz abrangendo as frequências de vocalização de interesse e são gravadas pelo programa Avisoft RECORDER (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics) e posteriormente analisadas pelo software Avisoft SASLab Pro (version 4.34; Avisoft Bioacoustics) que produz um espectrograma (com frequência de 488 Hz e resolução de 0,512 ms) das vocalizações emitidas pelo animal que foram posteriormente analisadas manualmente (PEREIRA et al., 2014; WENDLER et al., 2016).

Todas as USVs emitidas acima da faixa de 33-kHz foram consideradas USVs de 50-kHz. A classificação dos subtipos foi feita levando em consideração a forma do elemento fundamental da vocalização e sua relação com outros elementos secundários. As USVs denominadas *flat* eram assim classificadas quando as mudanças de frequência ao longo de um único elemento da USV eram iguais ou inferiores a 5-kHz. As USVs do tipo *trill* eram caracterizadas por alternâncias de frequência com picos em “zigue-zague”. As do tipo *step* precisavam apresentar um elemento fundamental e mais um outro elemento sobreposto no início ou fim do elemento fundamental com diferença de frequência entre eles superior a 5-kHz. Por último, as vocalizações *mixed* eram vocalizações que não se enquadravam em nenhuma das categorias anteriores (PEREIRA et al., 2014).

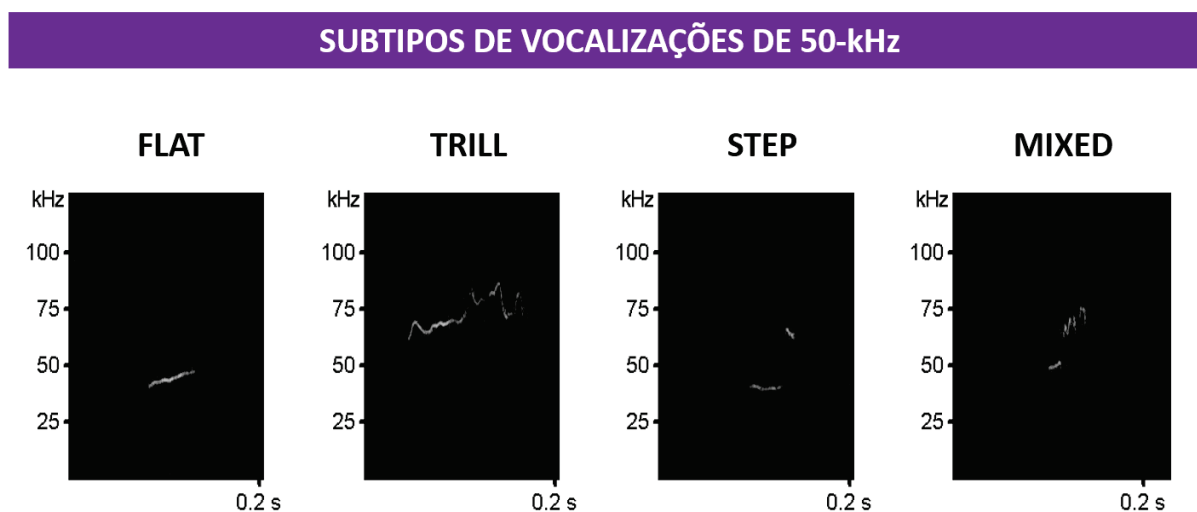


Figura 7: Espectrograma com cada imagem representando um dos subtipos das USVs de 50-kHz avaliadas neste trabalho.

Hiperlocomção e exploração em caixa de atividade

A análise da atividade locomotora e exploratória foi realizada em uma caixa de acrílico forrada com cepilho (40x40x50 cm) simultaneamente à gravação de vocalizações ultrassônicas em luminosidade de 4 lux por 10 minutos (NATUSCH; SCHWARTING, 2010). Os animais são primeiramente expostos à caixa de atividade em uma sessão de habituação por 10 minutos sem administração de nenhuma droga ou qualquer outra manipulação. No dia do teste, os animais são previamente privados de sono REM por 24h e seus controles isolados pelo mesmo período de tempo. A atividade locomotora e exploratória é monitorada e analisada por 10 minutos imediatamente após o período de privação de sono REM. A atividade locomotora é contabilizada pelo número de quadrantes que os animais cruzam durante os 10 minutos de teste e a atividade exploratória é avaliada através do número de *rearings* que estes animais apresentam neste mesmo período.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados deste estudo foram analisados por estatística paramétrica por ANOVA de 2 vias, seguidos de *post-hoc* de Newman-Keuls quando observadas interações dos fatores. Os dados comportamentais do Experimento 1 e 2 foram analisados primeiramente por ANOVA de 2 vias sem considerar o fator sexo, para se

avaliar apenas se a PSREM induzia uma alteração de comportamento que o lítio era capaz de reverter. Após essa análise, os dados do tratamento com lítio foram retirados da análise e uma ANOVA de 2 vias passou a ser utilizada para a observação do efeito e interação apenas do sexo/fase do ciclo estral/estradiol e da PSREM. Dados de avaliação de peso do útero e gordura abdominal foram avaliados por ANOVA de 1 via, seguidos de *post-hoc* de Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 FÊMEAS E MACHOS EXPRESSAM PERFIS DIFERENTES DE COMPORTAMENTOS TIPO MANÍACOS INDUZIDOS POR PSREM

Para a análise do efeito da PSREM na atividade locomotora e validade preditiva desse modelo com tratamento com lítio, primeiramente foi feita uma ANOVA de 2 vias (Figura 1A- material complementar) que mostrou efeito para os fatores PSREM [$F_{(1,125)} = 18,90$; $p < 0.05$] e tratamento com lítio [$F_{(1,125)} = 154,520$; $p < 0.05$] com interação entre esses dois fatores [$F_{(1,125)} = 8,75$; $p < 0.05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que a PSREM levou ao aumento de locomoção, comportamento esse que foi revertido com o tratamento com lítio, porém mostrando também efeito *per se* em animais não privados de sono, indicando efeito depressor desta dose. Portanto, nas análises subsequentes os animais tratados com lítio foram retirados. Após, foi feita uma ANOVA de 2 vias entre machos e fêmeas, levando em consideração os fatores PSREM e sexo (Figura 8A). Foi observado efeito da PSREM [$F_{(1,63)} = 13,12$; $p < 0.05$], mas não de sexo [$F_{(1,63)} = 2,65$; NS] e sem interação entre os dois fatores, mostrando então que a PSREM levou à um aumento de atividade locomotora em relação aos controles e esse aumento não foi sexo-dependente.

A análise do comportamento de *rearing* foi feita também primeiramente por ANOVA de 2 vias levando em conta PSREM e tratamento com lítio (Figura 1B- material complementar) que apontou efeito de ambos os fatores {PSREM [$F_{(1,125)} = 39,40$; $p < 0.05$]; tratamento com lítio [$F_{(1,125)} = 279,04$; $p < 0.05$]} mostrando interação entre eles [$F_{(1,125)} = 38,29$; $p < 0.05$]. Posteriormente o *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que PSREM levou ao aumento do número de *rearings*, e o lítio levou à uma diminuição desse comportamento, porém com efeito *per se* também em animais não privados de sono. Portanto, foi utilizado o mesmo procedimento de análise da

locomoção e realizada uma ANOVA de 2 vias entre machos e fêmeas (Figura 8B) que mostrou efeito tanto do fator PSREM [$F_{(1,63)} = 39,50$; $p < 0.05$] quanto do fator sexo [$F_{(1,63)} = 4,80$; $p < 0.05$] mas sem interação entre esses dois fatores [$F_{(1,63)} = 1,89$; NS].

Por último, em relação à emissão de USV de 50-kHz, a ANOVA de 2 vias entre PSREM e lítio mostrou efeito dos fatores: PSREM [$F_{(1,125)} = 40,47$; $p < 0.05$] e tratamento com lítio [$F_{(1,125)} = 31,00$; $p < 0.05$] além de interação entre eles [$F_{(1,125)} = 11,07$; $p < 0.05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que a PSREM levou ao aumento de USV de 50-kHz e o lítio levou à uma diminuição desse comportamento apenas em animais PSREM, sem apresentar efeito *per se*. Porém, para seguir o padrão de análise estatística empregado nos outros comportamentos, foi feita uma ANOVA de 2 vias entre machos e fêmeas (Figura 8C) com a exclusão dos animais tratados com lítio. A ANOVA mostrou efeito de PSREM [$F_{(1,63)} = 34,61$; $p < 0.05$] e de sexo [$F_{(1,63)} = 10,80$; $p < 0.05$] mas sem interação entre eles [$F_{(1,63)} = 0,96$; NS].

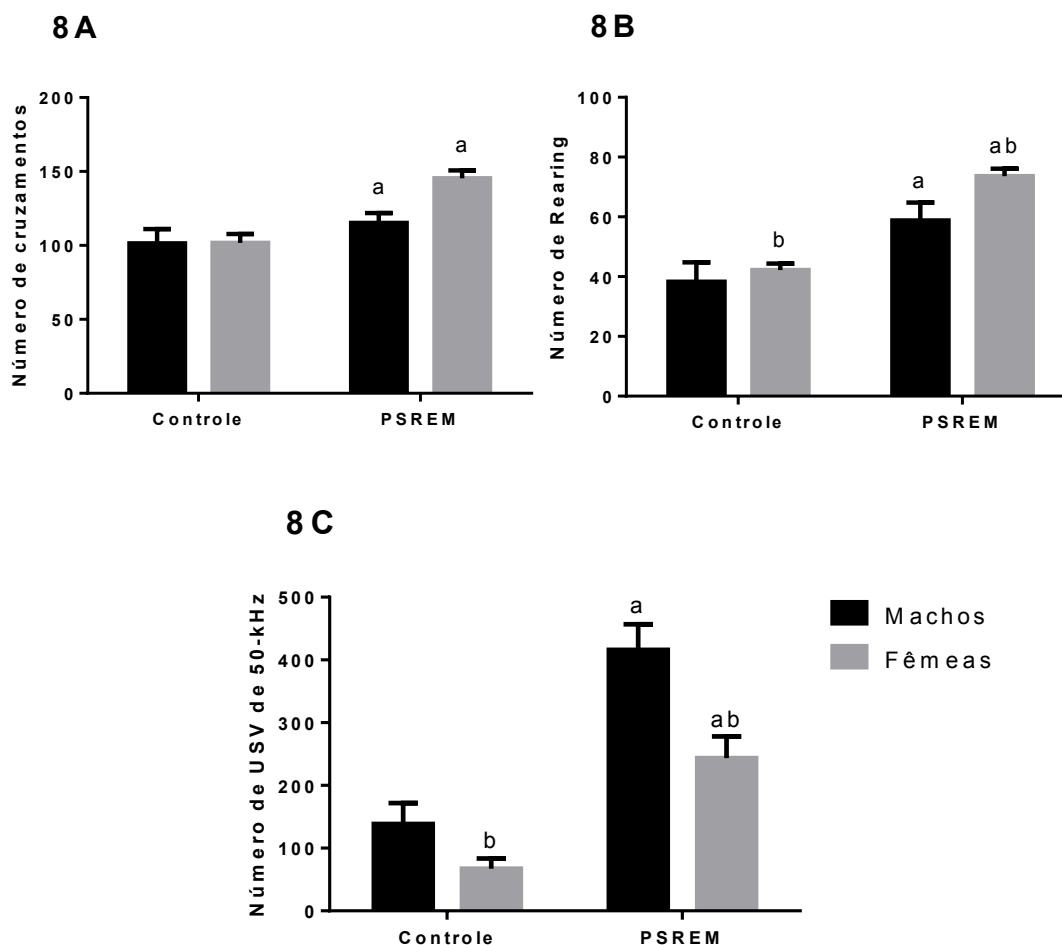


Figura 8: Diferenças de sexo na indução de mania por PSREM, comparação entre machos e fêmeas. 8A- locomoção em uma caixa de atividade; 8B- rearing (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em um comportamento exploratório); 8C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média + EPM (n = 7-32). a= $p < 0.05$ ≠ no fator PSREM. b= $p < 0.05$ ≠ no fator sexo.

5.2 A FASE DO CICLO ESTRAL INFLUENCIA A EMISSÃO DE USVS DE 50-KHZ, MAS NÃO O REARING OU A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO MODELO DE PSREM

Após ser observada diferença de sexo em alguns comportamentos tipo maníacos induzidos por PSREM, o seguinte passo foi analisar o efeito do ciclo estral nestes mesmos parâmetros comportamentais, separando as fêmeas entre as fases de diestro, estro e pró-estro. No parâmetro comportamental de locomoção já havia sido observado não haver influência do fator sexo. Uma ANOVA de 2 vias (Figura 9A)

levando em consideração apenas fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral e o fator PSREM mostrou que não houve também efeito da fase do ciclo estral [$F_{(2,45)} = 1,52$; NS], apenas do fator PSREM: [$F_{(1,45)} = 23,04$; $p < 0.05$], sem interação entre esses fatores, mostrando que o aumento de locomoção por PSREM é independente tanto de sexo quanto da fase do ciclo estral em fêmeas.

Para avaliar o efeito da fase do ciclo estral no comportamento de *rearing*, foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Ciclo Estral; Fator 2: PSREM) entre as fêmeas (Figura 9B) e também não foi observado efeito da fase do ciclo estral [$F_{(2,45)} = 2,74$; $p = 0.07$], apenas de PSREM: [$F_{(1,45)} = 57,42$; $p < 0.05$], sem interação desses fatores, mostrando que o comportamento de *rearing* apesar de diferir entre machos e fêmeas não difere dependendo da fase do ciclo em fêmeas.

Para a análise da influência do ciclo estral na emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz foi realizada uma ANOVA de 2 vias apenas entre fêmeas (Fator 1: Ciclo Estral; Fator 2: PSREM) (Figura 9C). Foi observado efeito tanto da fase do ciclo estral [$F_{(2,45)} = 6,20$; $p < 0.05$] quanto de PSREM: [$F_{(1,45)} = 25,96$; $p < 0.05$] porém sem interação desses fatores, mostrando que fêmeas em pró-estro controle e PSREM vocalizam mais que fêmeas nas outras fases do ciclo.

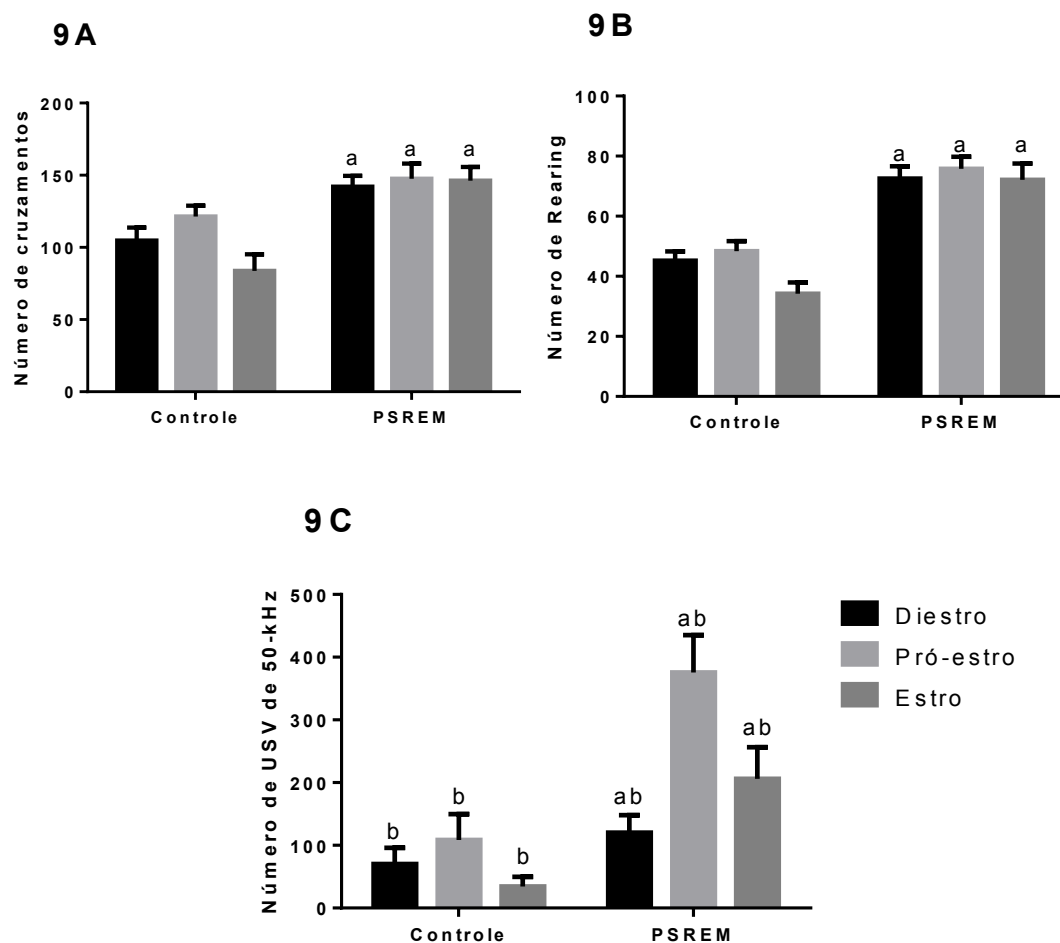


Figura 9: Diferenças de ciclo estral na indução de mania por PSREM, comparação entre fêmeas em diestro, pró-estro e estro. 9A- locomoção em uma caixa de atividade; 9B- número total de rearings; 9C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média + EPM (n = 8- 13). a= $p < 0.05 \neq$ no fator PSREM. b= $p < 0.05 \neq$ no fator fase do ciclo estral.

Para finalizar a comparação da influência de sexo e ciclo estral nos subtipos de vocalizações de 50-kHz induzidas por PSREM, essas USV foram subclassificadas em flat ou frequência modulada- FM (trill, step e mixed) e a média do seus números totais foram representadas em gráfico de barras (Figura 10). Foi realizada uma ANOVA de 2 vias entre machos e fêmeas (Fator 1: Sexo e Ciclo Estral; Fator 2: PSREM) para observar o efeito destes fatores sobre a emissão das USVs de 50-kHz FM. Foi observado efeito tanto do fator sexo e ciclo estral [$F(3,69) = 6,58; p < 0.05$] quanto de PSREM: [$F(1,69) = 24,02; p < 0.05$] com interação entre esses dois fatores [$F(3,69) = 2,80; p < 0.05$]. Post-hoc de Newman-Keuls mostrou que tanto machos

quanto fêmeas em pró-estro privadas de sono vocalizavam mais USV's de 50-kHz dos subtipos FM em comparação às fêmeas nas outras fases do ciclo.

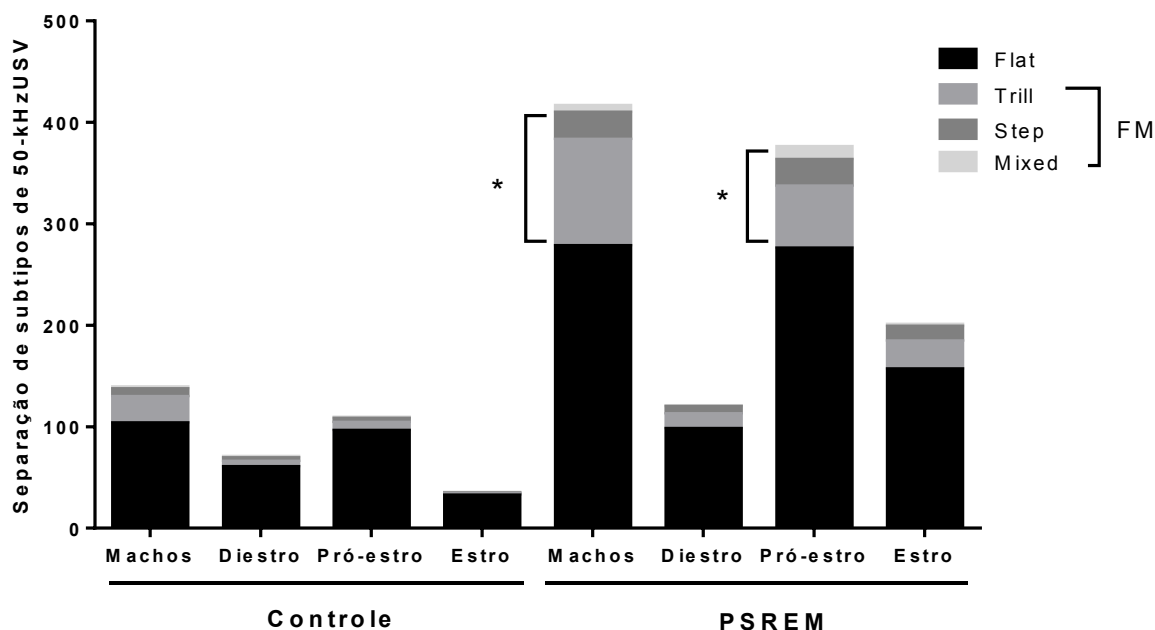


Figura 10: Comparação entre subtipos de USV de 50-kHz induzidas por PSREM em machos e fêmeas em diestro, pró-estro e estro. Os dados são expressos pela média de cada subtipo de USV (n=5-13). FM= frequência modulada (trill, step e mixed). *=p<0.05 em comparação ao seu próprio controle.

5.3 O ESTRADIOL INDUZ O AUMENTO DE USVS DE 50-KHZ, REARING E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM FÊMEAS OVX

Em sequência foi analisado o efeito da ausência de hormônios sexuais e o efeito agudo do hormônio estradiol nestes mesmos parâmetros comportamentais. Fêmeas foram ovariectomizadas e um grupo controle passou por cirurgia SHAM.

Fêmeas SHAM não diferem de outras fêmeas da mesma fase do ciclo estral (dados não mostrados) e, portanto, tiveram seus dados comportamentais incorporados nos grupos das fases do ciclo estral. Útero e gordura abdominal foram pesados e a confirmação da retirada dos ovários e da queda hormonal foi observada através do peso desses tecidos em relação ao grupo SHAM. ANOVA de uma via mostrou efeito do fator ovariectomia no peso do útero ($F_{(2,47)} = 38,54$; $p < 0.05$) e no peso da gordura ($F_{(2,47)} = 8,56$; $p < 0.05$). *Post-hoc* de Newman-Keuls apontou que a

ovariectomia levou à uma queda no peso do útero e em um ganho de gordura abdominal em relação ao grupo SHAM, fatores esses que não foram alterados pelo tratamento agudo com estradiol.

Tabela 1: Confirmação da perda de hormônio através de cirurgia de OVX por pesos absolutos do útero e gordura em relação ao grupo SHAM operado. Também se observou que o tratamento agudo com E2 não conseguiu reverter os efeitos de OVX do aumento do peso da gordura abdominal e diminuição do peso do útero. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo SHAM.

Tabela 1: Efeitos da OVX e do tratamento agudo com estradiol nos pesos absolutos do útero e gordura abdominal em fêmeas

Peso do Útero		
SHAM	OVX	OVX+E2
0,64±0,36	0,11±0,01*	0,12±0,03*
Peso da Gordura Abdominal		
SHAM	OVX	OVX+E2
1,94±0,28	2,62±0,79*	2,21±0,58*

Quanto ao efeito do tratamento de estradiol em fêmeas OVX no comportamento de locomoção, ao avaliar o efeito da PSREM e tratamento com lítio em fêmeas OVX sem considerar o efeito do estradiol, ANOVA de 2 vias mostrou que não houve efeito para o fator PSREM [$F_{(1,50)} = 0,20$; NS], apenas efeito para o tratamento com lítio [$F_{(1,50)} = 42,54$; $p < 0,05$] mostrando que a PSREM não levou à hiperlocomoção em fêmeas OVX. Para avaliar o efeito do estradiol agudo em fêmeas OVX, foi feita uma ANOVA de 2 vias (Figura 11A) que apontou efeito do estradiol [$F_{(1,25)} = 4,41$; $p < 0,05$] mostrando que o tratamento com estradiol tem efeito *per se* e que o tratamento com estradiol agudamente leva à um aumento de locomoção em fêmeas OVX.

Para a análise do comportamento de *rearing*, foi feita uma ANOVA de 2 vias entre os fatores PSREM e lítio que não apontou efeito do fator PSREM [$F_{(1,50)} = 0,10$; NS], porém mostrando efeito do tratamento com lítio [$F_{(1,50)} = 51,71$; $p < 0.05$] e com interação entre esses fatores [$F_{(1,50)} = 4,97$; $p < 0.05$]. O *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve um aumento de *rearing* induzido por PSREM que foi revertido com tratamento com lítio, porém com efeito *per se* do tratamento. Quando analisados apenas os fatores PSREM e tratamento com estradiol por ANOVA de 2 vias (Figura 11B), é observado que há efeito destes dois fatores {PSREM: [$F_{(1,25)} = 15,91$; $p < 0.05$]; estradiol: [$F_{(1,25)} = 26,57$; $p < 0.05$] mas sem interações entre ambos os fatores [$F_{(1,25)} = 0,01$; NS], mostrando que a PSREM leva à um aumento de *rearing* e tratamento com estradiol também leva à um aumento em relação às OVXs controle, mas que esses fatores não interagem entre si.

Por último, em relação à emissão de USV de 50-kHz, análise por ANOVA de 2 vias entre os fatores PSREM e lítio mostrou efeito de ambos: {PSREM [$F_{(1,50)} = 5,83$; $p < 0.05$]; tratamento com lítio [$F_{(1,50)} = 8,81$; $p < 0.05$] porém não havendo interação entre eles [$F_{(1,50)} = 2,29$; NS]. Após, ao fazer uma análise com ANOVA de 2 vias entre os fatores PSREM e estradiol (Figura 11C), foi visto efeito de ambos os fatores: {PSREM [$F_{(1,25)} = 4,65$; $p < 0.05$]; estradiol [$F_{(1,25)} = 4,48$; $p < 0.05$]} porém não havendo interação entre eles [$F_{(1,25)} = 1,66$; NS] mostrando que a PSREM e o estradiol levam ao aumento da emissão de USV de 50-kHz e esses dois efeitos não interagem entre si.

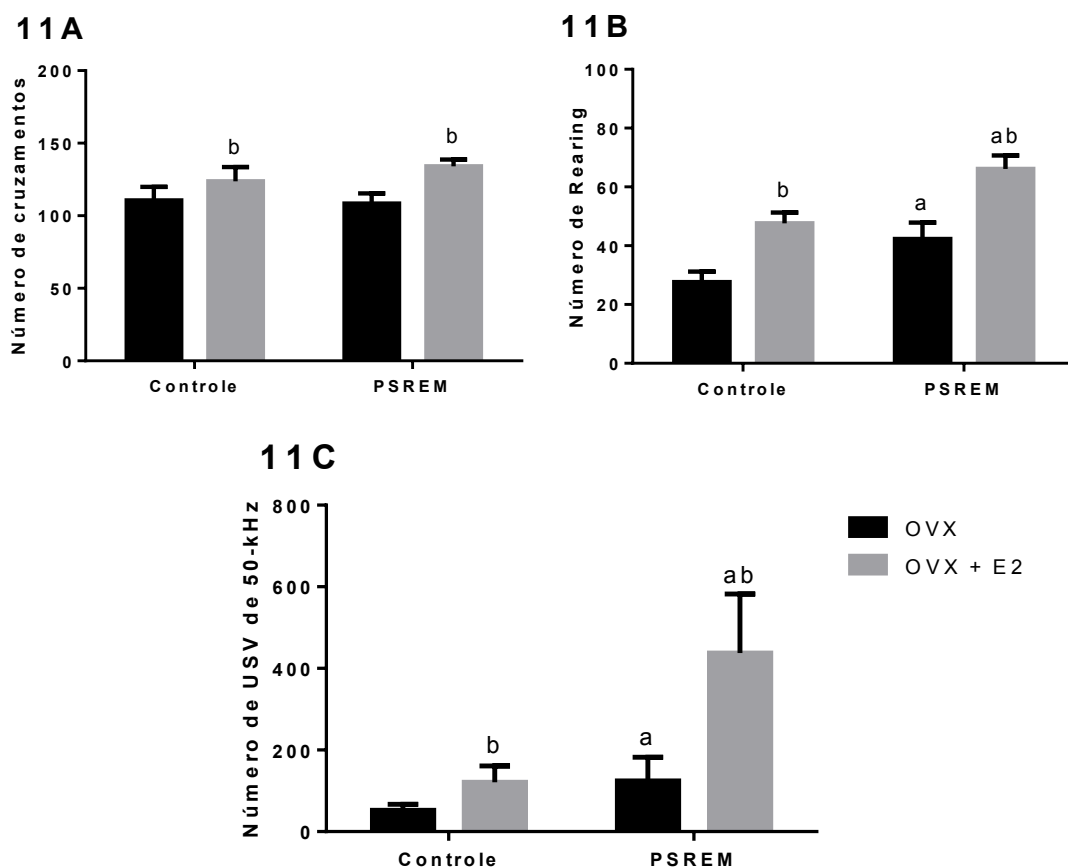


Figura 11: Efeito do 17- β -estradiol (E2) na indução de mania por PSREM, comparação entre fêmeas ovariectomizadas (OVX) e OVX tratadas agudamente com E2 (10 μ g/kg) 2 horas antes do teste. 11A- locomoção em uma caixa de atividades; 11B- rearing (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em um comportamento exploratório; 11C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média + EPM (n = 5- 13). Os dados são expressos por média (n = 6-10). a= $p < 0.05 \neq$ no fator PSREM. b= $p < 0.05 \neq$ no fator estradiol.

Para finalizar a comparação da influência da retirada de hormônios sexuais e do tratamento agudo com estradiol nas vocalizações de 50-kHz induzidas por PSREM, essas USV foram subclassificadas em flat ou frequência modulada- FM (trill, step e mixed) e a média do seus números totais foram representadas em gráfico de barras (Figura 12). Foi realizada uma ANOVA de 2 vias entre fêmeas OVX e OVX tratadas com estradiol (Fator 1: Estradiol; Fator 2: PSREM) para observar o efeito destes fatores sobre a emissão das USVs de 50-kHz FM. Foi observado efeito tanto do fator estradiol [$F_{(1,26)} = 6,70$; $p < 0.05$] quanto do fator PSREM: [$F_{(1,26)} = 5,99$; $p < 0.05$] com interação entre esses dois fatores : [$F_{(1,26)} = 2,80$; $p < 0.05$]. *Post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que fêmeas OVX tratadas com estradiol e privadas de sono

vocalizavam mais USV's de 50-kHz dos subtipos FM em comparação às OVX não tratadas.

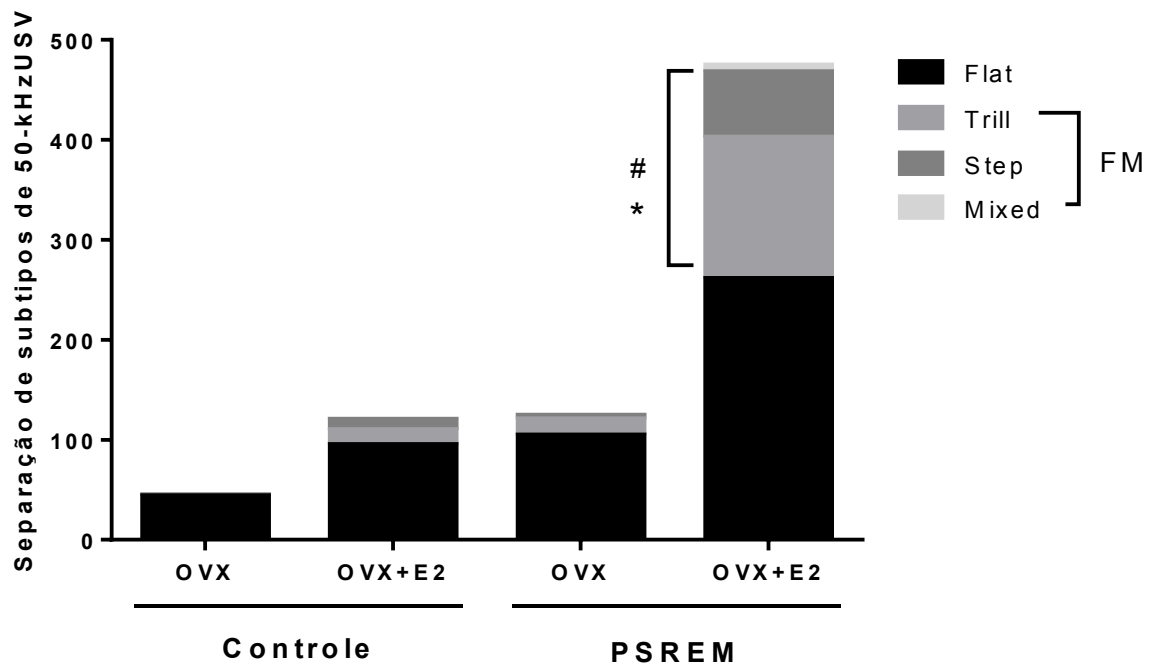


Figura 12: Comparação entre subtipos de USV de 50-kHz induzidas por PSREM em fêmeas OVX e OVX tratadas agudamente com estradiol (E2). Os dados são expressos pela média de cada subtipo de USV (n=6-10). FM= frequência modulada (trill, step e mixed). *=p<0.05 em comparação ao seu próprio controle. #=p<0.05 em comparação ao grupo OVX/PSREM.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a avaliar o efeito de sexo, fase do ciclo estral e do hormônio sexual estradiol nos comportamentos de locomoção, *rearing* e USVs de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono de 24h. Nesta tabela observa-se o resumo dos principais resultados obtidos:

Tabela 2: Influência de sexo, fase do ciclo estral e estradiol sobre os comportamentos de locomoção, *rearing* e USV's de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono de 24h

Comportamento	Sexo	Fase do ciclo estral	Estradiol
Locomoção	=	=	≠
Rearing	≠	=	≠
50-kHz USV	≠	≠	≠

Ainda se utiliza em grande parte animais machos no estudo pré-clínico farmacológico, porém podemos observar tentativas de mudança deste paradigma. Trabalhos como a revisão de Kokras (KOKRAS; DALLA, 2014) sobre as diferenças sexuais em modelos animais de transtornos psiquiátricos reforçam tanto a existência dessas diferenças quanto a importância de melhor estudá-las através da inclusão de fêmeas na pesquisa pré-clínica. Na tabela abaixo vemos dados já observados na literatura sobre diferenças sexuais em diversos testes e modelos de transtornos psiquiátricos. Este trabalho pode então adicionar à esta tabela, demonstrando pela primeira vez a existência de diferenças sexuais em comportamentos como a emissão de USV's de 50-kHz em modelo de mania por privação de sono.

Tabela 3: Comparação entre revisão de dados sobre diferença sexual em modelos animais de diversos transtornos psiquiátricos (KOKRAS; DALLA, 2014) e dados observados neste estudo:

Modelo/Teste	Comportamento	Vulnerabilidade
Teste do Nado Forçado	Imobilidade	Dados conflitantes
Desamparo aprendido	Fuga	Machos > Fêmeas
Campo Aberto	Tigmotaxia	Machos > Fêmeas
Labirinto em Cruz Elevado	Aversão à espaço aberto	Machos > Fêmeas
Medo condicionado ao contexto	Congelamento	Machos > Fêmeas
Choque de cauda	Sobressalto	Fêmeas > Machos
Auto-administração	Pressionamentos de barra	Fêmeas > Machos
Sensibilização locomotora	Locomoção	Fêmeas > Machos
Hiperlocomoção por psicoestimulantes	Locomoção	Fêmeas > Machos
Privação de sono	Latência para sono/ Locomoção	Sem diferenças
Privação de sono (dados deste estudo)	Locomoção	Sem diferenças
	<i>Rearing</i>	Fêmeas > Machos
	USV de 50-kHz	Machos > Fêmeas

Em áreas da pesquisa biológica como neurociências e psicofarmacologia, fêmeas são raramente utilizadas em estudos comportamentais. Em 1993, foi publicada uma diretriz pelo NIH reforçando a importância do uso de mulheres em estudos clínicos. Hoje, mais de duas décadas depois, a maioria dos estudos clínicos são feitos com ambos os sexos. Apesar do NIH ter publicado uma diretriz também para a utilização de fêmeas em 2014, não houve uma revolução parecida na utilização de fêmeas no

estudo pré-clínico como ocorreu no estudo clínico, e isso se reflete na escassez de dados comportamentais com fêmeas que se observa na literatura ainda hoje.

No presente estudo, machos e fêmeas foram utilizados e suas diferenças e semelhanças foram observadas frente ao modelo de mania por PSREM. A locomoção, parâmetro extensivamente utilizado na avaliação do comportamento tipo maníaco (EINAT, 2007), não demonstrou diferença entre os sexos, porém, essa diferença foi observada no *rearing*, um parâmetro relacionado ao comportamento exploratório. Outros estudos demonstraram que fêmeas parecem ser mais sensíveis à ação de psicoestimulantes e apresentam, dentre outros comportamentos, maior locomoção do que machos (HAAREN, VAN; MEYER, 1991; KUHN et al., 2001; HU et al., 2004). Tais diferenças podem ser explicadas devido ao fato que a hiperlocomoção induzida pelo modelo utilizado no presente estudo não ter sido robusta o suficiente para se observar efeito do sexo.

Em concordância com os resultados apresentados no presente trabalho, outros estudos já demonstraram que fêmeas apresentam maior número de *rearings* do que machos (SYME, 1975; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; FESTA et al., 2003, 2004; HUGHES et al., 2004). O aumento de *rearings* está relacionado à exploração diante de um ambiente novo e com estado de excitação e alerta (Lever et al., 2006). Vários estudos já mostraram que drogas dopaminérgicas que induzem hiperlocomoção como a anfetamina (PEREIRA et al., 2014) e lisdexanfetamina (WENDLER et al., 2016) são capazes de aumentar a frequência deste comportamento. Além disso, estimulações diretamente na VTA também levam ao aumento de *rearing* (CADOR et al., 1988; IKEMOTO, 2004), e fármacos inibitórios infundidos na VTA, como o baclofeno (um agonista direto nos receptores GABA), são capazes de inibir o *rearing* induzido por anfetamina (ZHOU et al., 2005).

Entretanto, aumento de locomoção e *rearing* nem sempre estão interligados. Já foi observado que manipulação farmacológica com psicoestimulantes pode aumentar a locomoção, porém reduzir o *rearing*, ou ainda aumentar o *rearing* sem alterar a locomoção (AL-KHATIB et al., 1995; ALVAREZ; RUARTE, 2001; ZHOU et al., 2005; WENDLER et al., 2016). Além disso, como o campo aberto foi originalmente feito dentro de campo muito maior do que os aparatos utilizados atualmente (HALL; L. BALLACHEY, 1931), o parâmetro locomoção pode ser afetado pelo diâmetro reduzido da caixa de atividade utilizada nesse experimento que, apesar de ser de um formato e parâmetros que propiciam a emissão de USVs de 50-kHz (NATUSCH;

SCHWARTING, 2010) talvez não seja ideal para a ambulação. Portanto, o aumento de atividade locomotora induzida por PSREM ter sido menos robusto que o comportamento de *rearing* pode ser devido alguns fatores. Uma caixa menor de atividade pode favorecer o aumento de *rearing* em detrimento da ambulação em comparação à um campo aberto (LEVER et al., 2006). Além disso, a PSREM de 24h pode não induzir a hiperlocomoção tão robustamente quanto outros modelos farmacológicos (WENDLER et al., 2016) ou até mesmo a PSREM de 72h (Wendler, 2016).

Outro parâmetro comportamental avaliado foi a emissão de USV de 50-kHz. Foi observado que a PSREM é capaz de aumentar o número total de vocalizações e a proporção de emissão dos subtipos frequência-modulada (FM- trill, step e mixed) em comparação aos animais controles (Wendler, 2016). Além disso, pela primeira vez verificamos o aumento de USVs por PSREM em fêmeas, e que existe diferença sexual no número dessas vocalizações emitidas. Outro estudo demonstrou que machos de arganazes do campo (uma outra espécie de roedor) emitem mais vocalizações de 50-kHz que fêmeas, tanto em número total e frequência, quanto na complexidade das vocalizações (MA et al., 2014). No presente trabalho, também foi observado efeito do sexo no número de USVs emitidas tanto espontaneamente quanto induzidas por PSREM, sendo que machos parecem vocalizar mais que fêmeas em ambas as situações.

Quando comparada a divisão do total de USVs em subtipos, observa-se que a quantidade relativa de USVs do tipo FM em machos parece ser maior que em fêmeas. Estudos já mostraram que as vocalizações de 50 kHz estão relacionadas a situações comportamentais positivas e podem ser aumentadas por estímulos hedônicos gratificantes (BRUDZYNSKI, 2015). No entanto, parece haver uma diferença no contexto em que as vocalizações são emitidas. Enquanto as USVs FM de 50-kHz são associadas a situações altamente gratificantes e de excitação emocional, as do tipo *flat* parecem ter papel de comunicação social (KNUTSON et al., 2002; BURGDORF et al., 2007, 2011). Sendo assim, essa alteração no perfil de subtipos de USV com aumento relativo dos subtipos frequência modulada poderia estar relacionado com a talilaquia e exacerbação emocional presentes na mania (PEREIRA et al., 2014; WENDLER et al., 2016; ENGELHARDT et al., 2018). Nada se sabe sobre o efeito do sexo na emissão de USVs apetitivas em modelo de mania, porém outros estudos também observam um número maior de USVs de machos do que de fêmeas em

outros modelos animais (CHERRY; LEPRI, 1986; FRÖHLICH et al., 2017), mostrando que parece haver relação dessa emissão com andrógenos em machos. Além disso, foi sugerido que a maior emissão de USVs de 50-kHz e com maior complexidade de subtipos em machos pode ser um resquício evolutivo de manutenção de status em machos (MA et al., 2014). Porém a extrapolação do real significado dessas vocalizações e o que cada subtipo significa ainda não é clara e podemos apenas sugerir que o aumento destas em modelo de mania é indício de um estado afetivo positivo (PEREIRA et al., 2014; WENDLER et al., 2016), sendo um importante parâmetro não locomotor para se avaliar o comportamento tipo maníaco em modelo animal.

Na literatura já foi observado efeito de sexo em diversos modelos animais de transtornos psiquiátricos: machos e fêmeas diferem em resposta a drogas de abuso (KUHN et al., 2001; SWEARINGEN, VAN et al., 2013; MITTAL et al., 2017) sendo que fêmeas se auto-administram mais do que machos (CARROLL et al., 2002; LYNCH et al., 2002; HU et al., 2004). Na avaliação do comportamento tipo depressivo, fêmeas apresentam maior vulnerabilidade nos testes mais comumente empregados, como o teste do nado forçado (DROSSOPOULOU et al., 2004; DALLA et al., 2008; KOKRAS et al., 2012). Em modelos de esquizofrenia, fêmeas mostram maior sensibilidade do que machos à hiperlocomoção, *sniffing* estereotipado e ataxia (ANDINÉ et al., 1999). Porém, no modelo de estimulação hipotalâmica em ratos, machos apresentavam maior locomoção, enquanto fêmeas apresentavam mais *rearing* e maior consumo de álcool (ABULSEOUD et al., 2015).

Tendo isso em vista, é razoável que frente ao modelo de mania por PSREM, machos e fêmeas também expressem seu comportamento de maneiras diferentes. Fêmeas geralmente são mais ativas no campo aberto e em testes de ansiedade. De fato, a análise do comportamento de fêmeas baseada apenas em locomoção pode ser enviesada (IMHOF et al., 1993), já que fêmeas tendem a se locomover mais que machos, e alguns testes comportamentais podem não ter o poder de discriminar entre ansiedade e estados de excitação locomotora (FERNANDES et al., 1999; DOREMUS et al., 2006). Neste ponto, a análise de USVs de 50-kHz se torna interessante por avaliar outro parâmetro comportamental na mania que não é baseado em locomoção. No presente estudo, portanto, ao induzir comportamento tipo maníaco é possível observar diferenças entre machos e fêmeas. Enquanto fêmeas parecem expressar mais comportamentos locomotores, como hiperlocomoção e *rearing*, machos

apresentaram maior expressão de vocalizações de 50-kHz, bem como uma mudança importante no perfil de subtipos de USV, aumentando a emissão de FMs em comparação as de tipo *flat*. Esses resultados podem refletir diferença sintomatológica que acontece na clínica, já que apesar da prevalência da doença ser parecida em ambos os sexos, homens parecem apresentar mais sintomas de hiperssexualidade, talilaquia e “incapacidade de manter uma conversa”, e grandiosidade; enquanto mulheres parecem apresentar maior labilidade do humor, humor deprimido e alucinações (TAYLOR; ABRAMS, 1981).

Visto que houve diferença entre os sexos nos comportamentos induzidos por PSREM, o próximo objetivo foi observar se a fase do ciclo estral em fêmeas também levaria a alterações comportamentais. Já foi observado na literatura que o comportamento e a atividade neuronal em fêmeas podem mudar dependendo da fase do ciclo estral. A emissão de vocalizações de fêmeas Long-Evans em resposta à presença de machos é maior nas fases de pró-estro e estro do que nas demais (MATOCHIK et al., 1992). O pró-estro parece reduzir a ansiedade no labirinto em cruz elevado em comparação às outras fases do ciclo estral (SAYIN et al., 2014). Fêmeas em estro são mais sensíveis à liberação de dopamina induzida por anfetamina (BECKER, 1990) levando a um comportamento de estereotipia mais predominante do que nas outras fases do ciclo. E além disso, fêmeas em estro e pró-estro apresentam níveis maiores de dopamina extracelular do que fêmeas em diestro ou ovariectomizadas (XIAO; BECKER, 1994).

No presente estudo foi observado que enquanto há diferença de sexo no comportamento exploratório induzido por PSREM, essas diferenças na locomoção e no *rearing* não parecem ser dependentes de fase do ciclo estral. Na literatura foram observadas diversas influências da flutuação hormonal em testes comportamentais como aumento de *freezing* em resposta a odor aversivo no estro (CHEN et al., 2009), fêmeas em pró-estro passarem mais tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado que fêmeas em diestro (MARCONDES et al.) e como hiperalgesia no diestro tardio (ou pró-estro) em comparação às outras fases, mas sem apresentar efeito de sexo entre machos e fêmeas (DEVALL et al., 2009). Em contraposição, diversos trabalhos mostram não haver diferença comportamental entre fases do ciclo estral, como ausência de diferença entre fêmeas em pró-estro e diestro em comportamentos de ansiedade e medo (HIROI; NEUMAIER, 2006), e que a fase do ciclo estral não

influencia o comportamento de fêmeas no teste do nado forçado (ALONSO et al., 1991; TONELLI et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; KOKRAS et al., 2012).

Apesar disso, foi observado efeito da fase do ciclo nas emissões de USV de 50-kHz, o que parece mostrar então que a avaliação de USVs de 50-kHz parece ser mais sensível aos efeitos de hormônios sexuais no comportamento de fêmeas do que a atividade locomotora. Fêmeas em pró-estro e estro emitem um número maior de vocalizações do que as fêmeas em diestro. O pró-estro coincide com o pico hormonal do estradiol e sua relação com a dopamina e comportamentos relacionados com aumento de dopamina já é bem estabelecida (YOEST et al., 2014). O estradiol é capaz de modular a atividade dopaminérgica mesolímbica em fêmeas, e, portanto, tem direto efeito na exacerbação de comportamentos motivados e busca por recompensas (YOEST et al., 2014). Não coincidentemente, o aumento de atividade dopaminérgica nessa via de ativação mesolímbica é crucial para a emissão de USVs de 50-kHz (RIPPBERGER et al., 2015).

Visto que a fase do ciclo estral de pico de estradiol foi a fase com maior emissão de USVs de 50-kHz, o próximo passo foi observar o efeito isolado no estradiol na emissão dessas vocalizações. A ovariectomia é um modelo de retirada de hormônios sexuais femininos que pode ser usado como modelo de pós-menopausa (DIAZ BRINTON, 2012) e a partir dele, podemos avaliar isoladamente o efeito de um ou outro hormônio sexual em diversos parâmetros comportamentais. Portanto, utilizando ratas OVX, pudemos observar, através de reposição aguda com 17β -estradiol, o efeito deste hormônio isoladamente na locomoção, *rearing* e emissão de USVs induzidas por PSREM. No parâmetro locomoção foi observada uma ausência de efeito da PSREM tanto em fêmeas OVX quanto naquelas OVX tratadas com E2 (17β -estradiol), o que pode novamente estar associado com a falta de robustez da PSREM de 24h na indução de hiperlocomoção. No parâmetro *rearing* foi observado um efeito da PSREM em ambos os grupos, mostrando que mais uma vez, o *rearing*, e não a ambulação, foi o parâmetro locomotor mais estimulado pela PSREM de 24h neste estudo. Além disso, o que foi observado tanto na locomoção quanto no *rearing* foi um efeito *per se* do estradiol, fazendo com que tanto animais controle quanto animais PSREM se locomovessem e explorassem mais que os animais OVX. Na literatura já foi observado que o tratamento com estradiol é capaz de induzir aumento de locomoção em fêmeas. Isso corrobora também com os comportamentos observados em fêmeas em pró-estro, que estão na fase de pico hormonal de

estradiol. O estrogênio influencia a atividade locomotora espontânea em ratas. Em fêmeas OVX, o tratamento com estradiol aumenta a atividade de corrida (MORGAN; PFAFF, 2002). Fêmeas tratadas com estradiol exibem também uma exacerbação da atividade locomotora induzida por anfetamina (BECKER; BEER, 1986; BECKER, 1990; BECKER et al., 2001).

Porém, um efeito inédito e importante observado do tratamento agudo com o estradiol foi sobre a emissão de USVs de 50-kHz. A administração de estradiol em fêmeas OVX não só levou ao efeito *per se* em fêmeas controle, como levou no grupo PSREM a um aumento de USV de 50-kHz equiparável àquele observado em machos. Ao observar os subtipos de vocalizações deste grupo, dá para notar que em torno de metade das USVs de 50-kHz emitidas são do subtipo frequência modulada, porcentagem essa maior que de qualquer outro grupo neste trabalho. O estradiol, portanto, parece exercer efeitos drásticos na emissão de USVs de 50-kHz. Na literatura, o estradiol demonstrou ter efeitos moduladores significativos sobre os sistemas dopaminérgicos em fêmeas, mas não demonstrou aumentar a liberação de dopamina estriatal em machos (BECKER, 1990; BECKER et al., 2005). O mecanismo pelo qual o estradiol é capaz de atuar em sistemas dopaminérgicos ainda não foi completamente elucidado, porém se sabe que o estradiol tem efeitos agudos e crônicos na liberação e recaptção de dopamina, e em alguns dos alvos da via de ativação do receptor de dopamina (YOEST et al., 2014). O efeito do estradiol em vias dopaminérgicas mesolímbicas, portanto, parece ser detectável através do aumento de USVs de 50-kHz.

Outro resultado observado neste estudo foi o efeito do tratamento agudo com lítio nas alterações comportamentais induzidas por PSREM de 24h. O lítio é o estabilizador de humor clássico tanto no tratamento agudo da mania (com a ajuda de antipsicóticos) como na manutenção do THB, e no estudo pré-clínico, o lítio é comumente utilizado como controle positivo em desenhos experimentais. A PSEM como modelo de mania foi validada através do tratamento com o lítio (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995) e já foi observado que o lítio é capaz de atenuar as vocalizações de 50-kHz induzidas por PSREM (Wendler, 2016). Já foi observado que o lítio na dose de 50mg/kg e 100 mg/kg (CAPPELIEZ; WHITE, 1981; FREY et al., 2006; PEREIRA et al., 2014) são capazes de atenuar a hiperlocomoção induzida por anfetamina, mas doses de até 300 mg/kg (TOMASIEWICZ et al., 2006) já foram utilizadas para se reverter completamente o aumento de locomoção induzido por anfetamina. Neste

trabalho, foi utilizada a dose de lítio já anteriormente utilizada no nosso laboratório, de 100 mg/kg. Porém, no presente estudo foi observado efeito *per se* do lítio à 100 mg/kg (Figuras 1 ABC e 2 ABC, material complementar). A dose utilizada neste trabalho foi uma que se mostrou eficaz na atenuação da emissão de USV de 50-kHz (PEREIRA et al., 2014; WENDLER et al., 2016) sem demonstrar efeito *per se* e, portanto, não foi feita uma curva dose resposta neste trabalho. Porém já foi observado que doses menores de lítio também são capazes de reduzir a emissão dessas vocalizações (Wendler, 2016). Como já foi visto que o modelo de mania por PSREM induz comportamentos tipo maníacos que podem ser atenuados por administração aguda de lítio (GESSA, GIAN LUIGI et al., 1995; ABRIAL et al., 2015), mas neste trabalho essa mesma dose induziu efeito depressor, nós decidimos não utilizar o tratamento com lítio na discussão central deste trabalho, pois seu efeito poderia influenciar o efeito observado dos fatores PSREM e sexo/ciclo estral e estradiol, fatores esses mais centrais à este trabalho.

A PSREM de 24h induziu alterações comportamentais interessantes, onde se pode observar efeito do sexo, efeito de fase do ciclo estral e efeito do hormônio estradiol, ora na locomoção, ora no comportamento de *rearing*, mas principalmente na emissão de USVs de 50-kHz. O estudo pré-clínico com fêmeas é limitado, e frequentemente se evita utilizá-las para não precisar lidar com flutuação hormonal no ciclo estral, não precisar aumentar o *n* do estudo, ou por simplesmente achar que não haverá diferenças entre machos e fêmeas no *endpoint* comportamental avaliado. O que se observa, porém, é que embora o fator flutuação hormonal seja de extrema importância no ciclo reprodutivo da mulher, a influência desses hormônios pode não interferir em todos os parâmetros comportamentais observados em modelo pré-clínico. Dependendo da natureza do *endpoint* que se quer avaliar, essa característica pode ser sexualmente dimórfica (sendo intrinsecamente diferente nos dois sexos), sexualmente diferente (o comportamento acontece num contínuo e a média entre machos e fêmeas é diferente) ou sexualmente divergente (quando o comportamento em nível basal é igual entre os sexos, porém ao introduzir um fator como o estresse, ou tratamento, ele passa a diferir entre eles), ou simplesmente não haver diferença de sexo (MCCARTHY et al., 2012). Além disso, mesmo que haja diferenças de ciclo, pode ser que os testes que utilizamos simplesmente não sejam sensíveis o suficiente para captar essas diferenças (KOKRAS et al., 2012). Ou ainda que mesmo que haja diferença entre fases do ciclo estral, essa diferença seja menor que o erro observado

em médias de machos (BECKER et al., 2016) que são susceptíveis a diferenças comportamentais induzidas por hierarquia social, por exemplo.

Neste estudo ao se avaliar comportamentos diferentes (locomotor/exploratório e USVs de 50-kHz) levando em consideração sexo, fase do ciclo estral e estradiol, foi possível observar que há diferenças entre machos e fêmeas, não apenas na locomoção, *rearing* e emissão de vocalizações de 50-kHz no presente estudo, mas também em diversos outros comportamentos descritos na literatura, e que o uso de ambos os sexos na modelagem de transtornos psiquiátricos é fundamental. Pode se observar também que nem todo parâmetro comportamental será dependente de fase do ciclo (como foi o caso da locomoção e *rearing*) e, portanto, nem sempre ao utilizar fêmeas é necessário discriminar entre as fases do ciclo estral e, portanto, aumentar o número de grupos experimentais. Por último, foi observado que existem parâmetros comportamentais como as USV de 50-kHz que são influenciados por flutuação hormonal em fêmeas e sofrem efeitos importantes de hormônios sexuais. Esses comportamentos são importantes e devem ser investigados mais profundamente para se entender melhor a interação de hormônios sexuais em mulheres com as vias de sinalização relacionadas a neurobiologia dessas doenças. A partir disso, muito pode ser aprendido em relação a diferenças de sintomatologia e resposta ao tratamento de diversas doenças entre homens e mulheres, diferença de vulnerabilidade e resiliência à doenças específicas dependente de sexo, e diferença de progressão da doença ao longo do ciclo reprodutivo da mulher.

7. CONCLUSÃO

A PSREM de 24h em ratos Wistar induz alterações comportamentais que são dependentes do sexo, do ciclo estral e do nível de estradiol. A hiperlocomoção e o *rearing* parecem ser mais afetados pelo modelo em fêmeas, enquanto machos apresentam uma emissão maior de USVs de 50-kHz. A emissão dessas USVs em fêmeas parece ser influenciada pela flutuação hormonal, sendo que fêmeas em pró-estro, no pico hormonal de estradiol, vocalizam mais que nas outras fases do ciclo estral, e isso é corroborado através da reposição de estradiol em fêmeas OVX, que induz a altos níveis de vocalizações de 50-kHz. A análise de USVs de 50-kHz parece ser mais sensível à flutuação hormonal em fêmeas do que a hiperlocomoção e o *rearing* e parece ser, portanto, um parâmetro comportamental importante e sensível na avaliação do estado afetivo do animal em modelo de mania.

REFERÊNCIAS

ABRIAL, E.; BETOURNE, A.; ETIEVANT, A.; et al. Protein Kinase C Inhibition Rescues Manic-Like Behaviors and Hippocampal Cell Proliferation Deficits in the Sleep Deprivation Model of Mania. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. pyu031-pyu031, 2015.

ABULSEOUD, O. A; GAWAD, N. A; MOHAMED, K.; et al. Sex differences in mania phenotype and ethanol consumption in the lateral hypothalamic kindled rat model. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. e534, 2015. Nature Publishing Group.

AL-KHATIB, I. M.; DÖKMECI, I.; FUJIWARA, M. Differential role of nucleus accumbens and caudate-putamen in mediating the effect of nomifensine and methamphetamine on ambulation and rearing of rats in the open-field test. **Japanese journal of pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69–77, 1995.

ALONSO, S. J.; CASTELLANO, M. A.; AFONSO, D.; RODRIGUEZ, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 1, p. 69–72, 1991.

ALVAREZ, E. O.; RUARTE, M. B. Role of glutamate receptors in the nucleus accumbens on behavioural responses to novel conflictive and non-conflictive environments in the rat. **Behavioural brain research**, v. 123, n. 2, p. 143–53, 2001.
AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 2013.

ANDINÉ, P.; WIDERMARK, N.; AXELSSON, R.; et al. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1393–408, 1999.

ANDRADE, S.; SILVEIRA, S. L.; ARBO, B. D.; et al. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 5, p. 687–690, 2010.

ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B. N.; et al. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 33, n. 6, p. 516–24, 2008.

ARMANI, F.; ANDERSEN, M. L.; ANDREATINI, R.; et al. Successful Combined Therapy with Tamoxifen and Lithium in a Paradoxical Sleep Deprivation-Induced Mania Model. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 18, n. 2, p. 119–125, 2012.

ARNOLD, L. M. Gender differences in bipolar disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 595–620, 2003.

ARONICA, S. M.; KRAUS, W. L.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8517–21, 1994.

ASGHAR, S. J.; TANAY, V. A. M. I.; BAKER, G. B.; GREENSHAW, A.; SILVERSTONE, P. H. Relationship of plasma amphetamine levels to physiological, subjective, cognitive and biochemical measures in healthy volunteers. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 18, n. 4, p. 291–299, 2003.

ASHOK, A. H.; MARQUES, T. R.; JAUHAR, S.; et al. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 666–679, 2017. Nature Publishing Group.

BALDASSANO, C. F.; MARANGELL, L. B.; GYULAI, L.; et al. Gender differences in bipolar disorder: Retrospective data from the first 500 STEP-BD participants. **Bipolar Disorders**, v. 7, n. 5, p. 465–470, 2005.

BARBINI, B.; BERTELLI, S.; COLOMBO, C.; SMERALDI, E. Sleep loss, a possible factor in augmenting manic episode. **Psychiatry Research**, v. 65, n. 2, p. 121–125, 1996.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. The Akt–GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 166–172, 2007.

BECKER, J. B. Direct effect of 17 β -estradiol on striatum: Sex differences in dopamine release. **Synapse**, v. 5, n. 2, p. 157–164, 1990.

BECKER, J. B.; ARNOLD, A. P.; BERKLEY, K. J.; et al. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1650–1673, 2005.

BECKER, J. B.; BEER, M. E. The influence of estrogen on nigrostriatal dopamine activity: behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components. **Behavioural brain research**, v. 19, n. 1, p. 27–33, 1986.

BECKER, J. B.; MOLENDI, H.; HUMMER, D. L. Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 937, p. 172–87, 2001.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, p. 34, 2016.

BEHL, C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 433–42, 2002.

BENZAZZI, F. Gender differences in bipolar II and unipolar depressed outpatients: A 557-case study. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 11, n. 2, p. 55–59, 1999.

BENEDETTI, F.; FRESI, F.; MACCIONI, P.; SMERALDI, E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 221–227, 2008.

BENMANSOUR, S.; PIOTROWSKI, J. P.; ALTAMIRANO, A. V; FRAZER, A. Impact of ovarian hormones on the modulation of the serotonin transporter by fluvoxamine. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 555–564, 2009.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. **Annual Review of Psychology**, v. 39, n. 1, p. 43–68, 1988.

BLEHAR, M. C.; DEPAULO, J. R.; GERSHON, E. S.; et al. Women with bipolar disorder: findings from the NIMH Genetics Initiative sample. **Psychopharmacology bulletin**, v. 34, n. 3, p. 239–43, 1998.

BRUDZYNSKI, S. M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance , Call Classification and Neural Substrate. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 180–192, 2015.

BURGDORF, J.; PANKSEPP, J.; MOSKAL, J. R. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 9, p. 1831–6, 2011.

BURGDORF, J.; WOOD, P. L.; KROES, R. A.; MOSKAL, J. R.; PANKSEPP, J. Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behavioural Brain Research**, v. 182, n. 2, p. 274–283, 2007.

CADOR, M.; KELLEY, A. E.; MOAL, M. LE; STINUS, L. d-Ala-met-enkephalin injection into the ventral tegmental area: effect on investigatory and spontaneous motor behaviour in the rat. **Psychopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 332–42, 1988.

CALLAGHAN, J. T.; BERGSTROM, R. F.; PTAK, L. R.; BEASLEY, C. M. Olanzapine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 37, n. 3, p. 177–193, 1999.

CAN, A.; SCHULZE, T. G.; GOULD, T. D. Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 123, p. 3–16, 2014. NIH Public Access.

CAPPELIEZ, P.; WHITE, N. Lithium induces dose-related increases and decreases in activity levels in the rat. **Psychopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 34–8, 1981.

CARROLL, M.; MORGAN, A.; LYNCH, W.; CAMPBELL, U.; DESS, N. Intravenous cocaine and heroin self-administration in rats selectively bred for differential saccharin intake: phenotype and sex differences. **Psychopharmacology**, v. 161, n. 3, p. 304–313, 2002.

CHALECKA-FRANASZEK, E.; CHUANG, D. M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, n. 15, p. 8745–50, 1999. National Academy of Sciences.

CHEN, W.; SHIELDS, J.; HUANG, W.; KING, J. A. Female fear: influence of estrus cycle on behavioral response and neuronal activation. **Behavioural brain research**, v. 201, n. 1, p. 8–13, 2009. NIH Public Access.

CHERRY, J. A.; LEPRI, J. J. Sexual dimorphism and gonadal control of ultrasonic vocalizations in adult pine voles, *Microtus pinetorum*. **Hormones and behavior**, v. 20, n. 1, p. 34–48, 1986.

CHOUINARD, G.; STEINBERG, S.; STEINER, W. Estrogen-progesterone combination: another mood stabilizer? **The American journal of psychiatry**, v. 144, n. 6, p. 826, 1987.

CIRILLO, P. C.; PASSOS, R. B. F.; BEVILAQUA, M. C. DO N.; LÓPEZ, J. R. R. A.; NARDI, A. E. Bipolar disorder and Premenstrual Syndrome or Premenstrual Dysphoric Disorder comorbidity: a systematic review. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 34, n. 4, p. 467–79, 2012.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; KOKRAS, N.; et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 3, p. 595–605, 2008.

DALTON, K. Menstruation and acute psychiatric illnesses. **British medical journal**, v. 1, n. 5115, p. 148–9, 1959.

DEV, V.; RANIWALLA, J. Quetiapine: a review of its safety in the management of schizophrenia. **Drug safety**, v. 23, n. 4, p. 295–307, 2000.

DEVALL, A. J.; LIU, Z.-W.; LOVICK, T. A. Hyperalgesia in the setting of anxiety: Sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 4, p. 587–596, 2009.

DEWING, P.; CHRISTENSEN, A.; BONDAR, G.; MICEVYCH, P. Protein kinase C signaling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates sexual receptivity in female rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 5934–5942, 2008.

DIAZ BRINTON, R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3571–8, 2012. The Endocrine Society.

DIFLORIO, A.; JONES, I. Is sex important? Gender differences in bipolar disorder. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, v. 22, n. 5, p. 437–52, 2010.

DOREMUS, T.; VARLINSKAYA, E.; SPEAR, L. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 570–577, 2006.

DROSSOPOULOU, G.; ANTONIOU, K.; KITRAKI, E.; et al. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. **Neuroscience**, v. 126, n. 4, p. 849–857, 2004.

EINAT, H. Establishment of a battery of simple models for facets of bipolar disorder: a practical approach to achieve increased validity, better screening and possible insights into endophenotypes of disease. **Behavior genetics**, v. 37, n. 1, p. 244–55, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16865528>>. Acesso em: 18/7/2016.

EINAT, H.; BELMAKER, R. H.; MANJI, H. K. New approaches to modeling bipolar disorder. **Psychopharmacology bulletin**, v. 37, n. 1, p. 47–63, 2003.

ENGELHARDT, K.-A.; SCHWARTING, R. K. W.; WÖHR, M. Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 1, p. 83–98, 2018.

FERNANDES, C.; GONZÁLEZ, M. I.; WILSON, C. A.; FILE, S. E. Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 64, n. 4, p. 731–8, 1999.

FERRIE, L. J.; GARTSIDE, S. E.; MARTIN, K. M.; YOUNG, A. H.; MCQUADE, R. Effect of chronic lithium treatment on D2/3 autoreceptor regulation of dopaminergic function in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 2, p. 218–225, 2008.

FESTA, E. D.; JENAB, S.; CHIN, J.; et al. Frequency of cocaine administration affects behavioral and endocrine responses in male and female Fischer rats. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 49, n. 8, p. 1275–80, 2003.

FESTA, E. D.; RUSSO, S. J.; GAZI, F. M.; et al. Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 5, p. 672–87, 2004.

FORNARO, M.; PERUGI, G. The impact of premenstrual dysphoric disorder among 92 bipolar patients. **Eur Psychiatry**, 2010.

FREY, B. N.; DIAS, R. S. Sex hormones and biomarkers of neuroprotection and neurodegeneration: Implications for female reproductive events in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 16, n. 1, p. 48–57, 2014.

FREY, B. N.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 31, n. 5, p. 326–32, 2006.

FRÖHLICH, H.; RAFIULLAH, R.; SCHMITT, N.; ABELE, S.; RAPPOLD, G. A. Foxp1 expression is essential for sex-specific murine neonatal ultrasonic vocalization. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 8, p. 1511–1521, 2017.

GAMBARANA, C.; GHIGLIERI, O.; MASI, F.; et al. The effects of long-term administration of rubidium or lithium on reactivity to stress and on dopamine output in the nucleus accumbens in rats. **BRAIN RESEARCH**, v. 826, n. 2, p. 200–209, 1999.

GARCIA-SEGURA, L. M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L. L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 29–60, 2001.

GERRITS, M.; GROOTKARIJN, A.; BEKKERING, B. F.; et al. Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the PVN of ovariectomized rats. **Brain research bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 147–55, 2005.

GESSA, G. L.; PANI, L.; FADDA, P.; FRATTA, W. Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. **European Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. SUPPL. 1, p. 89–93, 1995.

GESSA, G. L.; PANI, L.; SERRA, G.; FRATTA, W. Animal models of mania. **Advances in biochemical psychopharmacology**, v. 49, p. 43–66, 1995.

GITLIN, M. Treatment-resistant bipolar disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 3, p. 227–240, 2006.

GLASS, C. K. Differential Recognition of Target Genes by Nuclear Receptor Monomers, Dimers, and Heterodimers*. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, p. 391–407, 1994.

GOODE, N.; HUGHES, K.; WOODGETT, J. R.; PARKER, P. J. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 24, p. 16878–82, 1992.

GOODWIN, F. K.; JAMISON, K. R.; GHAEMI, S. N. **Manic-depressive illness: bipolar disorders and recurrent depression**. Oxford University Press, 2007.

GOODWIN, G. M. Bipolar disorder. **Medicine**, v. 44, n. 11, p. 661–663, 2016. Elsevier.

GOODWIN, G. M.; GEDDES, J. R. Latest maintenance data on lithium in bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology* . v. 13, 2003.

GRANDE, I.; BERK, M.; BIRMAHER, B.; VIETA, E. Bipolar disorder. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1561–1572, 2016. Elsevier Ltd.

HAAREN, F. VAN; MEYER, M. E. Sex differences in locomotor activity after acute and chronic cocaine administration. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 39, n. 4, p. 923–7, 1991.

HABIBI, N.; DODANGI, N.; NAZERI, A. Comparison of the effect of lithium plus quetiapine with lithium plus risperidone in children and adolescents with bipolar I disorder: a randomized clinical trial. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 31, p. 16, 2017. Iran University of Medical Sciences.

HALL, C. S.; L. BALLACHEY, E. **A Study of the Rat's behavior in a field: A Contribution to Method in Comparative Psychology**. 1931.

HARRISON, P. J.; GEDDES, J. R.; TUNBRIDGE, E. M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. **Trends in neurosciences**, v. 41, n. 1, p. 18–30, 2018.

HARSCH, H. H.; MILLER, M.; YOUNG, L. D. Induction of mania by L-dopa in a nonbipolar patient. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 5, n. 6, p. 338–9, 1985.

HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioural Brain Research**, v. 166, n. 1, p. 93–100, 2006.

HORST, G. J. TER; WICHMANN, R.; GERRITS, M.; WESTENBROEK, C.; LIN, Y. Sex differences in stress responses: Focus on ovarian hormones. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 239–249, 2009. Elsevier Inc.

HU, M.; CROMBAG, H. S.; ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Biological Basis of Sex Differences in the Propensity to Self-administer Cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 81–85, 2004.

HUGHES, R. N.; DESMOND, C. S.; FISHER, L. C. E. Room novelty, sex, scopolamine and their interactions as determinants of general activity and rearing, and light–dark preferences in rats. **Behavioural Processes**, v. 67, n. 2, p. 173–181, 2004.

HUI POON, S.; SIM, K.; BALDESSARINI, R. J. Pharmacological Approaches for Treatment-resistant Bipolar Disorder. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 592–604, 2015. Bentham Science Publishers.

IKEMOTO, S. Unconditional hyperactivity and transient reinforcing effects of NMDA administration into the ventral tegmental area in rats. **Psychopharmacology**, v. 172, n. 2, p. 202–10, 2004.

IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 2, p. 177–80, 1993.

IMPROTA-BREARS, T.; WHORTON, A. R.; CODAZZI, F.; et al. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4686–91, 1999.

IRWIN, R. W.; YAO, J.; HAMILTON, R. T.; et al. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 3167–75, 2008.

JACOBS, D.; SILVERSTONE, T. Dextroamphetamine-induced arousal in human subjects as a model for mania. **Psychological medicine**, v. 16, n. 2, p. 323–9, 1986.

JAKACKA, M.; ITO, M.; MARTINSON, F.; et al. An Estrogen Receptor (ER) α Deoxyribonucleic Acid-Binding Domain Knock-In Mutation Provides Evidence for Nonclassical ER Pathway Signaling *in Vivo*. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 10,

p. 2188–2201, 2002.

JOFFE, H.; COHEN, L. S.; SUPPES, T.; MCLAUGHLIN, W. L.; et al. Valproate is associated with new-onset oligoamenorrhea with hyperandrogenism in women with bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1078–86, 2006.

JOFFE, H.; COHEN, L. S.; SUPPES, T.; HWANG, C. H.; et al. Longitudinal follow-up of reproductive and metabolic features of valproate-associated polycystic ovarian syndrome features: A preliminary report. **Biological psychiatry**, v. 60, n. 12, p. 1378–81, 2006.

JUNEK, A.; RUSAK, B.; SEMBA, K. Short-term sleep deprivation may alter the dynamics of hippocampal cell proliferation in adult rats. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1140–1152, 2010. Elsevier Inc.

KELLY, M. J.; LAGRANGE, A. H.; WAGNER, E. J.; RØNNEKLEIV, O. K. Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. **Steroids**, v. 64, n. 1–2, p. 64–75, 1999.

KESSLER, R. C.; MCGONAGLE, K. A.; SWARTZ, M.; BLAZER, D. G.; NELSON, C. B. Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **Journal of Affective Disorders**, v. 29, n. 2–3, p. 85–96, 1993.

KETTER, T. A.; MILLER, S.; DELL’OSSO, B.; WANG, P. W. Treatment of bipolar disorder: Review of evidence regarding quetiapine and lithium. **Journal of Affective Disorders**, v. 191, p. 256–273, 2016.

KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological Bulletin**, v. 128, n. 6, p. 961–77, 2002.

KO, G. N.; LECKMAN, J. F.; HENINGER, G. R. Induction of rapid mood cycling during L-dopa treatment in a bipolar patient. **American Journal of Psychiatry**, v. 138, n. 12, p. 1624–1625, 1981.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595–4619, 2014.

KOKRAS, N.; DALLA, C.; SIDERIS, A. C.; et al. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 436–445, 2012.

KOMOSSA, K.; RUMMEL-KLUGE, C.; HUNGER, H.; et al. Olanzapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. **The Cochrane database of systematic reviews**, , n. 3, p. CD006654, 2010. Europe PMC Funders.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular immunology**, v. 294, n. 2, p. 63–9, 2015.

KOW, L. M.; BROWN, H. E.; PFAFF, D. W. Activation of protein kinase C in the hypothalamic ventromedial nucleus or the midbrain central gray facilitates lordosis. **Brain Research**, v. 660, n. 2, p. 241–248, 1994.

KUHN, C. M.; WALKER, Q. D.; KAPLAN, K. A.; LI, S. T. Sex, steroids, and stimulant sensitivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 937, p. 188–201, 2001.

KUMAR, C.; MCIVOR, R. J.; DAVIES, T.; et al. Estrogen administration does not reduce the rate of recurrence of affective psychosis after childbirth. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 112–8, 2003.

KUSHNER, P. J.; AGARD, D. A.; GREENE, G. L.; et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 74, n. 5, p. 311–7, 2000.

LEIBENLUFT, E.; ASHMAN, S. B.; FELDMAN-NAIM, S.; YONKERS, K. A. Lack of relationship between menstrual cycle phase and mood in a sample of women with rapid cycling bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 46, n. 4, p. 577–80, 1999.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 17, n. 1–2, 2006.

LEWIS, K. J. S.; FLORIO, A. DI; FORTY, L.; et al. Mania triggered by sleep loss and risk of postpartum psychosis in women with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 225, p. 624–629, 2018.

LUINE, V. N. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. **Experimental neurology**, v. 89, n. 2, p. 484–90, 1985.

LYNCH, W.; ROTH, M.; CARROLL, M. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. **Psychopharmacology**, v. 164, n. 2, p. 121–137, 2002.

MA, S. T.; RESENDEZ, S. L.; ARAGONA, B. J. Sex differences in the influence of social context, salient social stimulation and amphetamine on ultrasonic vocalizations in prairie voles. **Integrative Zoology**, v. 9, n. 3, p. 280–293, 2014.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J. C. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 209–224, 2004.

MACHADO-VIEIRA, R.; SOEIRO-DE-SOUZA, M. G.; RICHARDS, E. M.; TEIXEIRA, A. L.; ZARATE, C. A. Multiple levels of impaired neural plasticity and cellular resilience in bipolar disorder: developing treatments using an integrated translational approach. **The world journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 15, n. 2, p. 84–95, 2014.

MALHI, G. S.; TANIOUS, M.; DAS, P.; COULSTON, C. M.; BERK, M. Potential

Mechanisms of Action of Lithium in Bipolar Disorder. **CNS Drugs**, v. 27, n. 2, p. 135–153, 2013.

MANDELLI, L.; SOUERY, B.; BARTOVA, L.; et al. Bipolar II disorder as a risk factor for postpartum depression. **J Affect Disord**, v. 204, p. 54–58, 2016. Elsevier.

MANJI, H. K.; QUIROZ, J. A.; PAYNE, J. L.; et al. The underlying neurobiology of bipolar disorder. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 2, n. 3, p. 136–46, 2003. World Psychiatric Association.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K. J.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 435–40.

MARSH, W. K.; GERSHENSON, B.; ROTHSCCHILD, A. J. Symptom severity of bipolar disorder during the menopausal transition. **International Journal of Bipolar Disorders**, v. 3, n. 1, p. 17, 2015.

MARSH, W. K.; KETTER, T. A.; RASGON, N. L. Increased depressive symptoms in menopausal age women with bipolar disorder: Age and gender comparison. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 8, p. 798–802, 2009.

MATOCHIK, J. A.; WHITE, N. R.; BARFIELD, R. J. Variations in scent marking and ultrasonic vocalizations by Long-Evans rats across the estrous cycle. **Physiology and Behavior**, v. 51, n. 4, p. 783–786, 1992.

MCCARTHY, M. M.; ARNOLD, A. P.; BALL, G. F.; BLAUSTEIN, J. D.; VRIES, G. J. DE. Sex Differences in the Brain: The Not So Inconvenient Truth. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 7, p. 2241–2247, 2012.

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 357–84, 2002.

MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocrine reviews**, v. 20, n. 3, p. 279–307, 1999.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology ¹. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 3, p. 321–344, 1999.

MEINHARD, N.; KESSING, L. V.; VINBERG, M. The role of estrogen in bipolar disorder, a review. **Nordic journal of psychiatry**, v. 68, n. 2, p. 81–7, 2014.

MERIKANGAS, K. R.; JIN, R.; HE, J.; et al. Prevalence and Correlates of Bipolar Spectrum Disorder in the World Mental Health Survey Initiative. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, n. 3, p. 241–251, 2011.

MITTAL, N.; THAKORE, N.; BELL, R. L.; et al. Sex-specific ultrasonic vocalization patterns and alcohol consumption in high alcohol-drinking (HAD-1) rats. **Physiology & Behavior**, 2017. Elsevier Inc.

MOORE, J. D.; HAYES, C.; HICKS, R. A. REM sleep deprivation increases preference for novelty in rats. **Physiology & behavior**, v. 23, n. 5, p. 975–6, 1979.

MORGAN, M. A.; PFAFF, D. W. Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. **Behavioural brain research**, v. 132, n. 1, p. 85–93, 2002.

MUNK-OLSEN, T.; LAURSEN, T. M.; MENDELSON, T.; et al. Risks and predictors of readmission for a mental disorder during the postpartum period. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 189–95, 2009.

MUNK-OLSEN T; LAURSEN T; PEDERSEN C; MORS O; MORTENSEN P. New parents and mental disorders: A population-based register study. **JAMA**, v. 296, n. 21, p. 2582–2589, 2006.

NATUSCH, C.; SCHWARTING, R. K. W. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 96, n. 3, p. 251–9, 2010.

NOGOCEKE, F. P.; BARCARO, I. M. R.; SOUSA, D. P. DE; ANDREATINI, R. Antimanic-like effects of (R)-(-)-carvone and (S)-(+)-carvone in mice. **Neuroscience Letters**, v. 619, p. 43–48, 2016.

NUMAKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; NUMAKAWA, Y.; et al. Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. **Journal of toxicology**, v. 2011, p. 405194, 2011.

OPPENHEIM, G. A case of rapid mood cycling with estrogen: implications for therapy. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 45, n. 1, p. 34–5, 1984.

PARIAL, S. Bipolar disorder in women. **Indian journal of psychiatry**, v. 57, n. Suppl 2, p. S252-63, 2015.

PAYNE, J. L. The role of estrogen in mood disorders in women. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, v. 15, n. 3, p. 280–290, 2003.

PEREIRA, M.; ANDREATINI, R.; SCHWARTING, R. K. W.; BRENES, J. C. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania? **Psychopharmacology**, v. 231, n. 13, p. 2567–2577, 2014.

PERICH, T.; USSHER, J.; MEADE, T. Menopause and illness course in bipolar disorder: A systematic review. **Bipolar Disorders**, v. 19, n. 6, p. 434–443, 2017.

RASGON, N.; BAUER, M.; GLENN, T.; ELMAN, S.; WHYBROW, P. C. Menstrual cycle related mood changes in women with bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 5, n. 1, p. 48–52, 2003.

RASGON, N. L.; REYNOLDS, M. F.; ELMAN, S.; et al. Longitudinal evaluation of reproductive function in women treated for bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 89, n. 1–3, p. 217–25, 2005.

RIPPBERGER, H.; GAALEN, M. M. VAN; SCHWARTING, R. K. W.; WOHR, M. Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine- Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 220–32, 2015.

SAFE, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. **Vitamins and hormones**, v. 62, p. 231–52, 2001.

SANTIAGO, R. M.; TONIN, F. S.; BARBIERO, J.; et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, 2015.

SAYIN, A.; DERINOZ, O.; YUKSEL, N.; SAHIN, S.; BOLAY, H. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 180–187, 2014.

SELLIX, M. T.; EGLI, M.; HENDERSON, R. P.; FREEMAN, M. E. Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. **Brain research**, v. 1005, n. 1–2, p. 164–81, 2004.

SHIVAKUMAR, G.; BERNSTEIN, I. H.; SUPPES, T.; et al. Are bipolar mood symptoms affected by the phase of the menstrual cycle? **Journal of women's health (2002)**, v. 17, n. 3, p. 473–8, 2008.

SILVA MOREIRA, S. F. DA; NUNES, E. A.; KUO, J.; et al. Hypoestrogenism alters mood: Ketamine reverses depressive-like behavior induced by ovariectomy in rats. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2016. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences.

SILVERSTONE, T. Dopamine in manic depressive illness. A pharmacological synthesis. **Journal of affective disorders**, v. 8, n. 3, p. 225–31, 1985.

SIT, D.; SELTMAN, H.; WISNER, K. L. Menstrual effects on mood symptoms in treated women with bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 13, n. 3, p. 310–7, 2011.

SMITH, C. L.; O'MALLEY, B. W. Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 45–71, 2004.

STRECK, E. L.; SCAINI, G.; JEREMIAS, G. C.; et al. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. **Neurochemical research**, v. 40, n. 6, p. 1144–52, 2015.

SWEARINGEN, A. E. D. VAN; WALKER, Q. D.; KUHN, C. M. Sex differences in novelty- and psychostimulant-induced behaviors of C57BL/6 mice. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 3, p. 707–18, 2013. NIH Public Access.

SYAN, S. K.; MINUZZI, L.; SMITH, M.; et al. Brain Structure and Function in Women

with Comorbid Bipolar and Premenstrual Dysphoric Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, p. 301, 2018.

SYME, L. A. Influence of age and sex on the behavior of rats deprived of the rearing response. **Developmental Psychobiology**, v. 8, n. 1, p. 35–39, 1975.

SZABO, S. T.; MACHADO-VIEIRA, R.; YUAN, P.; et al. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 47–55, 2009. NIH Public Access.

TAYLOR, M. A.; ABRAMS, R. Gender differences in bipolar affective disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 3, n. 3, p. 261–271, 1981. Elsevier.

TEATERO, M. L.; MAZMANIAN, D.; SHARMA, V. Effects of the menstrual cycle on bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, v. 16, n. 1, p. 22–36, 2014.

THOMSON, M.; SHARMA, V. Between a rock-a-bye and a hard place: mood disorders during the peripartum period. **CNS Spectrums**, v. 22, n. S1, p. 49–64, 2017.

TOMASIEWICZ, H. C.; MAGUE, S. D.; COHEN, B. M.; CARLEZON, W. A. Behavioral effects of short-term administration of lithium and valproic acid in rats. **Brain research**, v. 1093, n. 1, p. 83–94, 2006.

TONELLI, L. H.; HOLMES, A.; POSTOLACHE, T. T. Intranasal Immune Challenge Induces Sex-Dependent Depressive-Like Behavior and Cytokine Expression in the Brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 1038–1048, 2008.

TORAN-ALLERAND, C. D. Estrogen and the brain: Beyond ER- α and ER- β **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 11–12 SPEC. ISS., p. 1579–1586, 2004.

TSAI, M.; O'MALLEY, B. W. Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 451–486, 1994.

TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L.; BITTENCOURT, L. R. A.; MELLO, M. T. DE. Paradoxical sleep deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 81, n. 3, p. 521–38, 2009.

VIGUERA, A. C.; TONDO, L.; KOUKOPOULOS, A. E.; et al. Episodes of mood disorders in 2,252 pregnancies and postpartum periods. **The American journal of psychiatry**, v. 168, n. 11, p. 1179–85, 2011.

WANG, L.; ANDERSSON, S.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-A. Estrogen Actions in the Brain. **Science Signaling**, v. 2002, n. 138, p. pe29-pe29, 2002.

WEBB, P.; LOPEZ, G. N.; UHT, R. M.; KUSHNER, P. J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 443–456, 1995.

WEHR, T. A.; GOODWIN, F. K.; WIRZ-JUSTICE, A.; BREITMAIER, J.; CRAIG, C. 48-hour sleep-wake cycles in manic-depressive illness: naturalistic observations and sleep deprivation experiments. **Archives of general psychiatry**, v. 39, n. 5, p. 559–65, 1982.

WEIGEL, N. L.; ZHANG, Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 76, n. 7, p. 469–79, 1998.

WEISER, M. J.; FORADORI, C. D.; HANDA, R. J. Estrogen receptor beta in the brain: From form to function. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 309–320, 2008. Elsevier.

WENDLER, E.; SOUZA, C. P. DE; VECCHIA, D. D.; et al. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1900–1908, 2016.

WIECK, A. Endocrine aspects of postnatal mental disorders. **Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology**, v. 3, n. 4, p. 857–77, 1989.

WILLIAMS, R. S. B.; CHENG, L.; MUDGE, A. W.; HARWOOD, A. J. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. **Nature**, v. 417, n. 6886, p. 292–295, 2002.

WINTER, C.; RUMOHR, A. VON; MUNDT, A.; et al. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. **Behavioural brain research**, v. 184, n. 2, p. 133–41, 2007.

WISNER, K.; STOWE, Z. Psychobiology of Postpartum Mood Disorders. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 15, n. 1, p. 77–89, 1997.

WITTCHEN, H.-U.; BECKER, E.; LIEB, R.; KRAUSE, P. Prevalence, incidence and stability of premenstrual dysphoric disorder in the community. **Psychological medicine**, v. 32, n. 1, p. 119–32, 2002.

XIAO, L.; BECKER, J. B. Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. **Neuroscience letters**, v. 180, n. 2, p. 155–8, 1994.

YOEST, K. E.; CUMMINGS, J. A.; BECKER, J. B. Estradiol, dopamine and motivation. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 14, n. 2, p. 83–9, 2014. NIH Public Access.

YOUNG, A. H.; MCELROY, S. L.; OLAUSSON, B.; et al. A randomised, placebo-controlled 52-week trial of continued quetiapine treatment in recently depressed patients with bipolar I and bipolar II disorder. **The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological**

Psychiatry, v. 15, n. 2, p. 96–112, 2014.

YOUNG, J. W.; HENRY, B. L.; GEYER, M. A. Predictive animal models of mania: Hits, misses and future directions. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1263–1284, 2011.

YOUNG, R. C.; MOLINE, M.; KLEYMAN, F. Hormone Replacement Therapy and Late-Life Mania. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 179–181, 1997. American Association for Geriatric Psychiatry.

ZHANG, F.; PHIEL, C. J.; SPECE, L.; GURVICH, N.; KLEIN, P. S. Inhibitory Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) in Response to Lithium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33067–33077, 2003.

ZHOU, W.; MAILLOUX, A. W.; MCGINTY, J. F. Intracerebral Baclofen Administration Decreases Amphetamine-Induced Behavior and Neuropeptide Gene Expression in the Striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 880–890, 2005.

ANEXO 1- EFEITO DO MODELO DE PSREM DE 24H SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO MANÍACOS E DO TRATAMENTO COM LÍTIO EM MACHOS E FÊMEAS

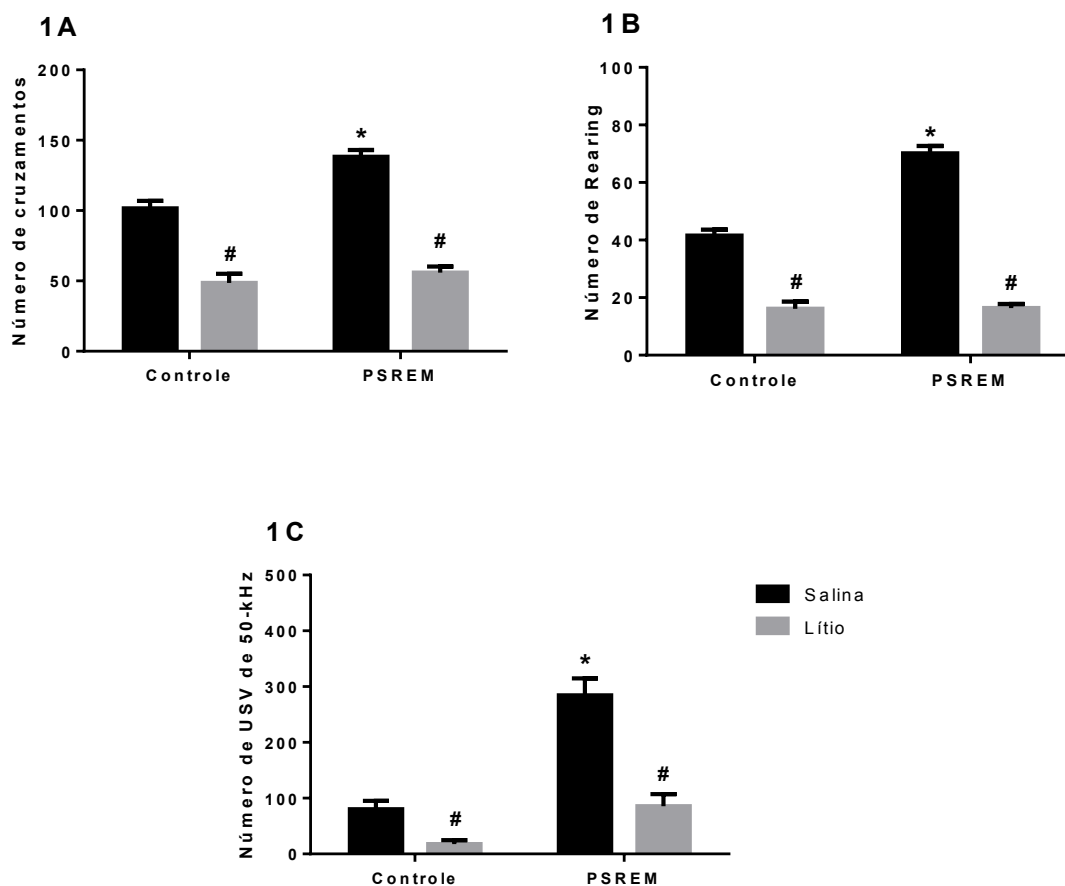


Figura A1: Efeito do modelo de PSREM de 24h e do tratamento com lítio em machos e fêmeas. 1A- locomoção em uma caixa de atividade; 1B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em um comportamento exploratório; 1C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média + EPM (n = 30-39). *= p<0.05 ≠ em comparação ao grupo Controle/Salina. #= p<0.05 em comparação ao seu respectivo grupo Salina.

ANEXO 2- EFEITO DO MODELO DE PSREM DE 24H SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO MANÍACOS E DO TRATAMENTO COM LÍCIO EM FÊMEAS OVX

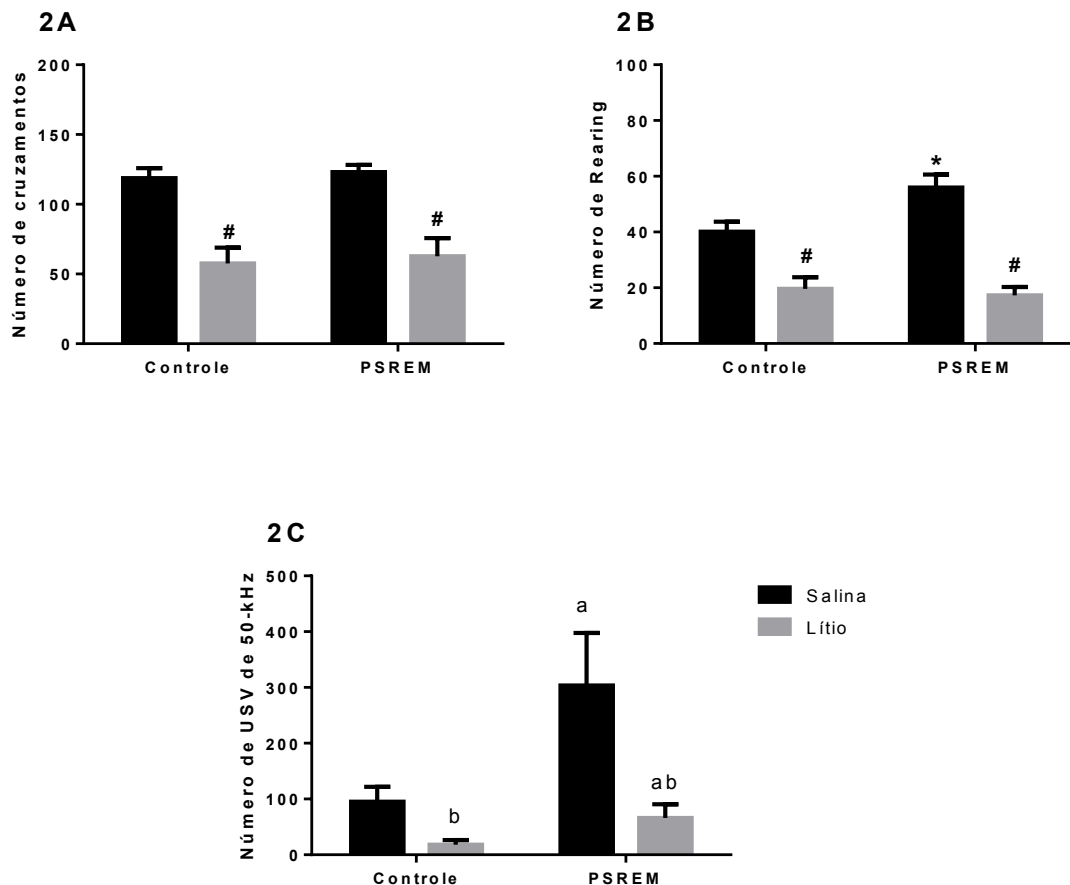


Figura A2: Efeito do modelo de PSREM de 24h e do tratamento com lítio em fêmeas ovariectomizadas. 1A- locomoção em uma caixa de atividade; 1B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em um comportamento exploratório); 1C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média + EPM (n = 11-16). * = $p < 0.05$ ≠ em comparação ao grupo Controle/Salina. # = $p < 0.05$ em comparação ao seu respectivo grupo Salina. a = $p < 0.05$ ≠ no fator PSREM. b = $p < 0.05$ ≠ no fator lítio.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 982

CERTIFICADO

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

STATEMENT

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

PROCESSO/PROCESS: 23075.129605/2016-89

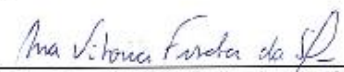
APROVADO/APPROVAL: 07/06/2016 – R.O. 05/2016

TÍTULO: Avaliação da diferença sexual em modelos de mania induzida por privação de sono em ratos Wistar

TITLE: Sex difference in Wistar rats submitted to sleep deprivation model of mania

AUTORES/AUTHORS: Roberto Andreatini, Camila Pasquini de Souza

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia



Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA