

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
LETÍCIA TREIN MEDEIROS

**EFEITO DA QUERCETINA EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS TIPO
MANÍACOS INUDIZIDOS POR ANFETAMINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

CURITIBA
2017

LETÍCIA TREIN MEDEIROS

**EFEITO DA QUERCETINA EM PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS TIPO
MANÍACOS INUDIZIDOS POR ANFETAMINA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Monografia apresentada como requisito à
obtenção do grau de bacharel, Curso de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná
Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA
2017

“Nossa existência deforma o universo.

Isso é responsabilidade”

Delirium

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Roberto Andreatini, por me dar a chance de desenvolver esse trabalho.

À minha querida co-orientadora Camila Pasquini de Souza por todo o apoio que me deu durante o desenvolvimento deste trabalho. Assim como aos meus colegas no departamento de farmacologia da UFPR.

Aos meus melhores amigos Julie Yoko, Maria Carolina, André Olivotto, Natália Maschio, Maria Cândida e Claudia Borio pelos vários anos de amizade e companheirismo, por estarem comigo durante a jornada acadêmica e em tantos os momentos. Ao meu companheiro e amigo Rafael da Cunha, por ter me dado suporte durante esses anos.

À minha família Gabriel, Denise, Alexander, Eduardo, Abigail, Claudio, Amanda e Ariel pelo apoio, amor e carinho.

Às minhas amigas Nilce Folle e Maristela Azevedo pelo apoio, amizade e companhia as tardes, noites e até madrugadas dentro do laboratório.

À minha primeira orientadora, mestra e querida Sonia R. Grötzner, por todo o ensinamento, amizade e carinho.

À minha falecida segunda mãe D. Rita Segalla, por todo amor, companhia e ensinamentos.

RESUMO

O Transtorno de Humor Bipolar é uma doença psiquiátrica complexa que apresenta uma alteração entre episódios depressivos e maníacos nos pacientes. Esse transtorno possui poucas alternativas farmacológicas para seu tratamento, necessitando da análise de potenciais fármacos antimaníacos. Para o estudo de novos tratamentos, são utilizados modelos animais individuais para depressão e mania. O presente trabalho avaliou o efeito do potencial antimaníaco da quercetina sob o comportamento tipo maníaco induzido por anfetamina em ratos machos e fêmeas. Para a análise dos parâmetros de comportamento tipo maníaco foram avaliados o aumento da locomoção, do *rearing*, da emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz, de exploração e impulsividade induzida por anfetamina. Entre tais parâmetros houve uma redução com o tratamento com quercetina, em machos, na locomoção, *rearing* e emissão de vocalizações do subtipo *trill*. Já nas fêmeas apenas o *rearing* foi alterado. O resultado da diferença entre os sexos se mostrou um fator importante no desenho de um experimento para a validação do fármaco. Por fim, a quercetina mostrou efeitos atenuantes de alguns aspectos da mania, sendo um composto promissor para o tratamento do transtorno de humor bipolar.

Palavras-chave: Anfetamina, Quercetina, Transtorno de Bipolar, Fêmeas

ABSTRACT

The Bipolar Disorder is a complex psychological illness that presents alternating depressive and manic episodes. This disorder has few pharmacological alternatives for its treatment, demanding the discovery of new antimanic drugs. For the study of new treatments, separate animal models of depression and mania are commonly used. This study used male and female rats with manic like behavior induced by amphetamine as animal models, and the quercetin flavonoid as a new antimanic drug. To analyze the manic like behavior parameters, it was evaluated the increase of locomotion, rearing, ultrasonic vocalization at 50-kHz, exploration and impulsiveness induced by amphetamine. Among the given parameters, significant difference was observed in males with quercetin treatment on locomotion, rearing and trill subtype vocalization. On the females, only the rearing was modified. This study concludes that it is fundamental to evaluate new drugs in both male and female animals, since the results are not necessarily the same for them. Regarding the quercetin, it's a drug that attenuates some manic aspects, and is a promissory drug for the treatment of bipolar disorder.

Key-words: Amphetamine, Quercetin, Bipolar Disorder, Female

LISTA DE SIGLAS

CMC - Carboximetilcelulose

FM - Frequências moduladas

PKC - Proteína Quinase C

THB - Transtorno de Humor Bipolar

USV - Vocalizações Ultrassônicas

VMAT - Transportador vesicular de monoaminas

WBB – Wire Bream Bride – Modelo da Ponte de Arame

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	9
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E HIPÓTESE.....	9
1.3. JUSTIFICATIVA.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. O TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR	12
2.3. FÁRMACOS ESTABILIZADORES DE HUMOR	13
2.4. MODELOS ANIMAIS PARA MANIA	14
2.5. ANFETAMINA COMO INDUTOR DE COMPORTAMENTO TIPO MANÍACO	14
2.6. HIPERLOCOMOÇÃO E VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ.....	16
2.7. QUERCETINA E POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO.....	18
2.8. COMPARAÇÃO ENTRE MACHOS E FÊMEAS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. ANIMAIS.....	19
3.2. DROGAS.....	19
3.3. CRONOGRAMA EXPERIMENTAL E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	19
3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	21
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
4.RESULTADOS	24
4.1.INDUÇÃO DO ESTADO DE MANIA.....	24
4.2.ANÁLISE DE LOCOMOÇÃO E EXPLORAÇÃO	24
4.3.ANÁLISE DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA (USV) DE 50-KHZ	25
4.4.ANÁLISE DO TESTE DA PONTE DE ARAME (WBB)	28
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS	31

1.INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E HIPÓTESE

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma enfermidade complexa que é definida por estágios de humor depressivo e de humor maníaco. O estágio depressivo se assemelha ao transtorno de depressão unipolar, envolvendo todos os aspectos típicos da doença, como anedonia, humor depressivo, baixa autoestima e pensamentos suicidas (LOGAN & MCCLUNG, 2015). Já o estágio de humor maníaco tem como principais características a alta autoestima, humor elevado, agitação, comportamentos de risco, euforia e hipersexualidade. (LOGAN & MCCLUNG, 2015; COSGROVE et al 2016; MILLER, 2016; KATO, 2017).

Esse transtorno possui poucas alternativas farmacológicas para seu tratamento, sendo mais comumente utilizado como estabilizador de humor o lítio, anticonvulsivantes e antipsicóticos (MILLER, 2016). Todavia os efeitos colaterais desses fármacos são intensos e apresentam muita variação de efetividade entre os pacientes, de forma que é necessária a avaliação de novos compostos para tratamentos alternativos (EISNER et al., 2017).

Na pesquisa de novos fármacos são feitos testes comportamentais com substâncias com um potencial efeito de estabilizador de humor. Entretanto, é necessário um modelo animal capaz de simular os estágios da doença. Os modelos validados, entretanto, não reproduzem perfeitamente os sintomas de ambas fases em modelo animal. Dessa forma, a avaliação de novos fármacos é feita utilizando modelos de depressão e mania separadamente. Os modelos de depressão utilizados são os mesmos para o estudo da depressão unipolar. Já os modelos para a mania são mais variados. O mais comum é através do uso agudo de psicoestimulantes (como a anfetamina) (PEREIRA et al., 2014). Outra alternativa importante é induzir o comportamento tipo maníaco pela privação de sono REM por 72 h (KANAZAWA et al., 2016)

Entre as características do episódio maníaco, o comportamento mais estudado nos modelos animais é a hiperatividade. A capacidade exploratória e locomotora do animal pode ser avaliada através de testes de campo aberto, onde os animais em estado tipo maníaco apresentam aumento de ambos aspectos. A hiperlocomoção não é uma

característica exclusiva da mania, então outros critérios mais precisos devem ser avaliados. Atualmente, vários trabalhos vêm analisando a emissão de vocalizações ultrassônicas (USV) como um novo parâmetro do comportamento tipo maníaco. Foi observado que animais em estado tipo maníaco emitem mais USV a 50-kHz. Essas vocalizações estão relacionadas à comunicação social e afetos positivos, o que pode simular o discurso acelerado e euforia típicos da mania no THB (BURKE et al., 2017). Ainda, outros testes propõem a análise da impulsividade e comportamento de risco dos animais, como no caso do teste da ponte de arame modificado (Wire Bream Bride - WBB) (ZHOU et al. 2015)

A origem do THB e as modificações no cérebro dos portadores ainda são pouco conhecidas (LOGAN & MCCLUNG, 2015; KATO, 2017). Atualmente duas hipóteses são mais aceitas. A primeira é chamado de teoria dopaminérgica, onde foram observadas variações na concentração de monoaminas (principalmente dopamina) no cérebro, como no núcleo accumbens, amígdala, estriado e córtex frontal, durante os estágios de mania e depressão. Essa hipótese é sustentada pelo fato de psicoestimulantes (como a anfetamina) levarem ao aumento significativo de dopamina na fenda sináptica, atuando sobre o transportador vesicular de monoaminas e acaretarem sinais e sintomas maníacos em voluntários normais. Além disso, no cérebro de pacientes portadores de THB (*post-mortem*) e em pacientes vivos em fase maníaca ou eutímica (por ressonância magnética funcional), foram observadas alterações na concentração de receptores e transportadores dopaminérgicos. Ainda nesses pacientes foi observado o aumento da atividade da Proteína quinase-C (PKC), um dos segundos mensageiros da resposta dopaminérgica do neurônio pós-sináptico (ASHOK et al., 2017).

A segunda hipótese trata de alterações mitocondriais. Em alguns pacientes, foi observado polimorfismo no DNA mitocondrial, alterações de pH intracelular e aumento de estresse oxidativo. Essa é sustentada pelo possível mecanismo de ação do lítio, que leva a uma redução de radicais livres no ambiente mitocondrial (KATO, 2017).

Dessa forma, a busca por um novo estabilizador de humor pode se focar em fármacos que atuem em elementos envolvidos nas hipóteses. Um desses é a quercetina, que é um fármaco já utilizado pela capacidade de reduzir radicais livres, atuando o estresse oxidativo decorrido das mitocôndrias, e que possui um potencial de reduzir a

atividade da PKC, dessa forma, reduzindo a resposta dopaminérgica. (KANAZAWA et al 2017).

Esse trabalho busca avaliar o potencial da quercetina como um estabilizador de humor, utilizando como modelo a indução de mania por anfetamina em ratos machos e fêmeas, avaliando os parâmetros de locomoção, exploração, impulsividade, comportamento de risco e emissão de USV de 50-kHz.

Como hipótese, espera-se que a quercetina seja capaz de reduzir a (a) locomoção, (b) elevada exploração, (c) amenizar o aumento de impulsividade e (d) comportamentos de risco e (e) emissão total de USV e redução das frequências moduladas, induzidas por anfetaminas, tanto em machos como em fêmeas.

1.2. OBJETIVOS

Geral: Avaliar o efeito do tratamento com quercetina no comportamento maníaco induzido por anfetamina em machos e fêmeas.

Específicos:

1- Avaliar o efeito na emissão de USV a 50-kHz, na atividade locomotora e exploratória e em parâmetros de impulsividade em ratos machos e fêmeas pela indução por anfetamina.

2- Avaliar o efeito do tratamento agudo com o flavonóide quercetina sobre os comportamentos induzidos por anfetamina em ratos machos e fêmeas

3- Avaliar a diferença sexual na indução do comportamento tipo maníaco e também no efeito do tratamento com quercetina através da emissão de USV a 50-kHz, atividade locomotora e exploratória e de parâmetros de impulsividade.

1.3. JUSTIFICATIVA

São necessários estudos sobre quercetina como fármaco antimaniaco, utilizando parâmetros diferentes de apenas a hiperlocomoção e também outra espécie animal (*Rattus norvegicus*), para maior validade do seu potencial efeito antimaniaco. Além disso, é necessário também utilizar fêmeas em testes de novos fármacos, uma vez que os transtornos psiquiátricos ocorrem em ambos sexos, mas os estudos não consideram variações biológicas sexo-específicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma doença complexa que atinge aproximadamente 2 a 4% da população mundial (ASHOK et al., 2017). Ela é definida por alterações de episódios de humor depressivo e humor maníaco ou hipomaníaco, passando por um humor eutímico entre os estados. Os episódios depressivos são semelhantes à depressão unipolar definido pelo DSM-V, que inclui tristeza, fadiga, alterações de sono, distúrbios alimentares, baixa autoestima, pensamentos de culpa e de suicídio. Já os episódios maníacos estão envolvidos com hiperatividade, humor elevado, agitação, comportamentos de riscos e impulsivos, redução da capacidade de discernimento, pensamento acelerado, alta autoestima, hipersexualidade, pouca necessidade de sono, em alguns casos, quadros de psicoses (PEREIRA et al., 2014; LOGAN & MCCLUNG, 2015; MILLER, 2016; KATO, 2017).

A causa do THB não é clara. Apesar disso, estudos apontam que o aparecimento do transtorno pode possuir uma origem genética e também devido a fatores ambientais, de forma que o tratamento da doença se torna um grande desafio. (LOGAN & MCCLUNG, 2015; KATO, 2017).

2.2. NEUROBIOLOGIA POR TRÁS DO TRANSTORNO BIPOLAR

O mecanismo por trás do THB e o seu aparecimento não são totalmente esclarecidos. As duas hipóteses mais aceitas para a explicação da neurobiologia da doença são a (a) hipótese mitocondrial e (b) hipótese dopaminérgica.

A primeira consiste em que o THB tem origem na alteração da atividade mitocondrial. Essa hipótese tem base em que 21% dos portadores de disfunções mitocondriais apresentavam o THB, uma prevalência quase 20 vezes maior que a média global (KATO, 2017). Posteriormente também foram verificados polimorfismos no DNA mitocondrial, alterações de pH celular decorrentes da mudança na atividade mitocondrial, aumento do estresse oxidativo e alterações na sinalização de cálcio mitocondrial (KATO, 2017).

Já no aspecto de neurotransmissores, os portadores do THB possuem alterações no sistema dopaminérgico em regiões do sistema límbico e córtex frontal. Historicamente, os quadros maníacos eram tidos como alta concentração de dopamina nessas regiões e o quadro depressivo como baixa concentração. Recentemente foram observadas mais alterações do sistema, então ele foi descrito como mais complexo do que apenas alterações pontuais de concentração de dopamina (COUSINS et al, 2009; ASHOK et al, 2017). A densidade de receptores D1, D2 e D3 em diferentes regiões dopaminérgicas (alguns núcleos da base e córtex pré-frontal) e o polimorfismo da VMAT (transportador vesicular de monoaminas) são apontados como maiores fatores de risco para o aparecimento do THB, onde a falha da homeostase entre transportadores e receptores dopaminérgicos levaria aos estados depressivos e maníacos da doença (ASHOK et al., 2017). Ainda no aspecto dopaminérgico, pacientes com THB também apresentam um aumento significativo na atividade da PKC, que atua como segundo mensageiro no neurônio pós-sináptico depois da ativação de receptores dopaminérgicos, o que leva a uma ampliação do sinal dado pela dopamina a esse neurônio (COUSINS et al, 2009).

Por fim, o aumento da atividade dopaminérgica devida às alterações do metabolismo e regulação da liberação de dopamina em regiões como núcleo accumbens, estriado e outras áreas límbicas, leva ao aparecimento dos comportamentos maníacos, como hiperatividade, impulsividade e aumento de libido (ASHOK et al., 2017).

2.3. FÁRMACOS ESTABILIZADORES DE HUMOR

Para o tratamento do THB não é recomendado o uso de antidepressivos, uma vez que possui pouca eficácia no tratamento da depressão bipolar como também pode piorar o curso da doença à longo prazo (MILLER, 2016). Atualmente, o tratamento farmacológico mais eficiente é o uso de estabilizadores de humor como o lítio e os anticonvulsivantes valproato e carbamazepina. Fármacos antipsicóticos também podem ser usados. Contudo o tratamento desse transtorno é complexo e ainda possui uma grande limitação, uma vez que nem todos os pacientes respondem ao uso dos atuais medicamentos. (MILLER, 2016; EISNER et al., 2017).

O mecanismo de ação dos fármacos estabilizadores de humor é diverso e também não elucidado por completo. A principal teoria do funcionamento do lítio é pela depleção de inositol, que leva um desbalanço de fosfatidilinositol, reduzindo a atividade da PKC, conseqüentemente da ação da dopamina no neurônio pós-sináptico. O valporato atua modulando a PKC, aumenta a inibição GABAérgica, modulando canais de voltagem dependente, entre outras ações. Já a carbamazepina é um modulador de canais de sódio voltagem-dependente. A atuação desses anticonvulsivantes sobre a estabilização do humor também não é totalmente clara. Por fim, os antipsicóticos são utilizados em casos de mania aguda, possuindo um efeito mais rápido, atuando como antagonistas D2 (ASHOK et al, 2017).

De forma geral, não é totalmente claro o mecanismo de ação dos estabilizadores de humor, dificultando ainda mais a busca por novos fármacos mais eficazes. Contudo, drogas que atuem em algum dos mecanismos propostos pelas duas hipóteses direcionam a pesquisa.

2.4. MODELOS ANIMAIS PARA MANIA

Devida a característica oscilatória da doença, é um desafio encontrar um modelo para reprodução completa do THB. Entretanto, é possível reproduzir separadamente os estados do transtorno. Os modelos de depressão são mais comumente estudados, enquanto para a mania, os trabalhos são escassos e focam na hiperlocomoção como único parâmetro para avaliação do estado tipo maníaco.

Para a indução da hiperlocomoção, são utilizados psicoestimulantes (como a anfetamina, lisdexamfetamina e metilfenidato), da oubaina (um inibidor da enzima Na,K-ATPase) ou de quinpirole (agonista de receptor D2) (PEREIRA et al., 2014; KANAZAWA et al., 2016; COSGROVE et al 2016). O método não farmacológico da privação de sono REM por 72h, que além da hiperlocomoção, é capaz de induzir outros fenótipos maníacos, como a insônia, agressividade e hipersexualidade (COSGROVE et al, 2016).

2.5. ANFETAMINA COMO INDUTOR DE COMPORTAMENTO TIPO MANÍACO

Em modelos animais, é comum usar como um indutor do estado de mania um fármaco psicoestimulante como a anfetamina. Ela foi utilizada neste trabalho devido a alta capacidade de aumentar a emissão de USV de 50-kHz (PEREIRA et al, 2014).

O mecanismo de ação da anfetamina é atuando sobre o equilíbrio de monoaminas (dopamina) no interior do neurônio pré-sináptico e na fenda sináptica. Esta possui uma fórmula e estrutura semelhante a das monoaminas (Figura 1), de forma que na fenda sináptica, ela se associa a dois Na^+ e um Cl^- , e é transportada ativamente para o terminal pré-sináptico pelo transportador de recaptação de monoaminas. Uma vez dentro da célula, a anfetamina desloca as monoaminas do *pool* citosólico e interage com o VMAT (transportador vesicular de monoaminas), o que evita o armazenamento das monoaminas em vesículas intraneurais, resultando na reversão do transportador de recaptação, fazendo com que as monoaminas sejam bombeadas para a sinapse afim de reequilibrar o balanço de monoaminas (Figura 2). Ainda, a anfetamina é capaz de inibir a monoamina oxidase (MAO) evitando que as monoaminas sejam degradadas aumentando mais ainda concentração (HEAL et al., 2013).

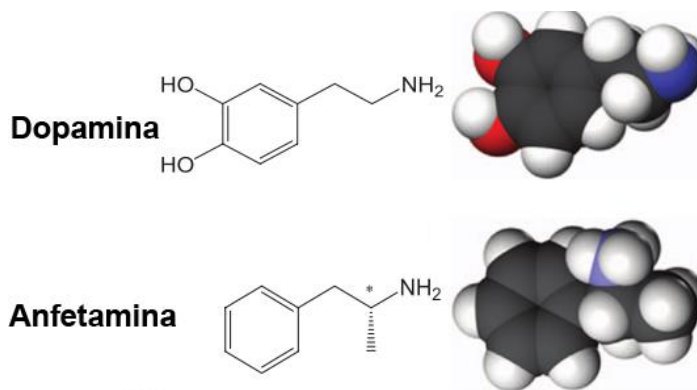


Figura 1 : Estrutura química e tridimensional da dopamina e da anfetamina. Adaptado de Heal et al, 2013.

Agora, com o aumento da disponibilidade de monoaminas, principalmente da dopamina, na sinapse ocorre uma elevação da frequência de interação desses neurotransmissores com seus receptores, levando a um aumento da transmissão de sinal e ativação do neurônio pós-sináptico. A ativação dos neurônios em determinadas áreas cerebrais leva ao aparecimento dos sintomas maníacos. Por exemplo, um aumento de atividade dopaminérgica no núcleo accumbens leva a um aumento da

impulsividade; na amígdala, comportamentos sexuais e agressividade. De forma geral um aumento dopaminérgico na região mesolímbica leva a alterações de humor e dos comportamentos maníacos (HEAL et al, 2013; ASHOK et al, 2017).

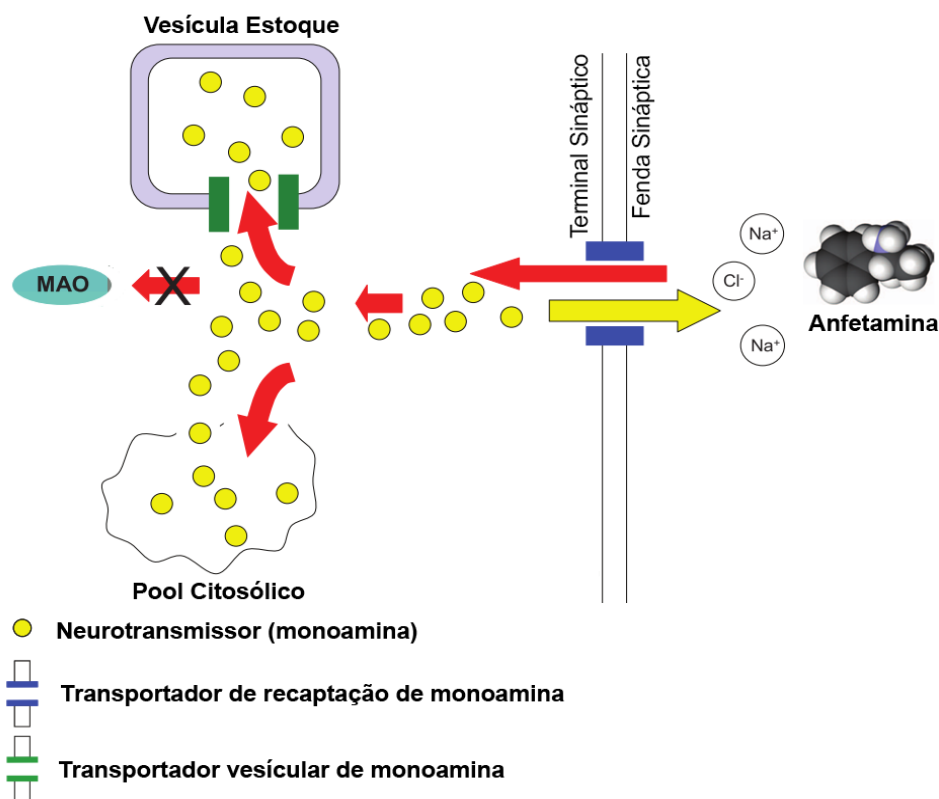


Figura 2: Ilustração do mecanismo de ação da anfetamina no neurônio pré-sináptico. Adaptado de Heal et al, 2013.

2.6. HIPERLOCOMOÇÃO E VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50-KHZ

Para a análise do comportamento tipo maníaco em animais, a maioria dos trabalhos utiliza como principal parâmetro a hiperlocomoção. Para sua análise, um animal é colocado no teste de campo aberto ou em uma caixa de locomoção, onde é observado o quanto ele se move durante um determinado tempo. Animais em estado maníaco tem um aumento do comportamento de locomoção, ou seja, uma hiperlocomoção. Entretanto mesmo sendo o principal parâmetro utilizado, a hiperlocomoção não é muito específica, de forma que é necessário a utilização de mais

parâmetros para a avaliação do estado maníaco, como é o caso da avaliação das vocalizações ultrassônicas (USV) de 50-kHz (PEREIRA et al, 2014).

As vocalizações ultrassônicas de 50-kHz parecem estar relacionadas ao afeto positivo, sendo observadas em situações de recompensa social e não social, durante o acasalamento, durante brincadeiras e também depois da administração de cocaína e apomorfina (ENGELHARDT et al., 2017 e WENDLER et al., 2016). O trabalho de Pereira et al (2014) utilizou as vocalizações ultrassônicas (USV) de 50-kHz como um novo parâmetro para o comportamento maníaco, sugerindo ser um comportamento relacionado com a euforia e discurso acelerado típico da mania.

As vocalizações ultrassônicas de 50-kHz são subdivididas em dois grupos, as do tipo *flat* e as frequências moduladas (FM). As vocalizações *Flat-call* são retas que não possuem uma variação superior a 5-kHz na amplitude, estando mais relacionadas à comunicação social e são mais comumente emitidas. Já as FM estão relacionadas mais afeto positivo, tendo menor frequência de emissão. Elas por sua vez são divididas em três subtipos: a primeira é a *Trill*, uma vocalização semelhante a um zig-zag onde os picos superiores e inferiores se diferenciam por mais de 5-kHz (Figura 3). O segundo subtipo é chamado de *Step-call*, que vez é caracterizado por uma emissão reta com uma outra emissão emendada (antes ou depois) com uma diferença de pelo menos 5-kHz, formando como se fosse um degrau entre as emissões. Por fim, o último subtipo é chamado como *Mixed call* que é uma frequência modulada que não encaixa em nenhuma das outras categorias ou aparenta ser uma mistura entre elas (PEREIRA et al, 2014; ENGELHARDT et al., 2017; BURKE et al., 2017).

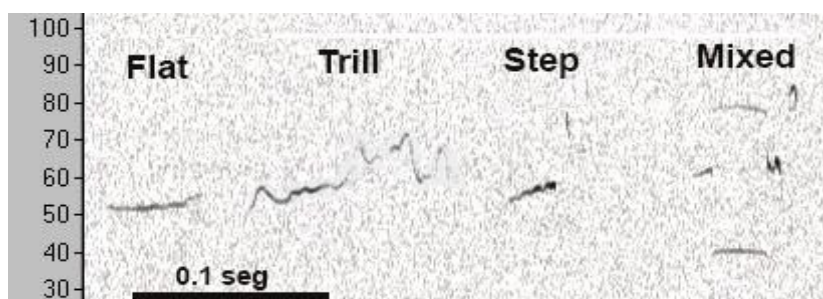


Figura 3: Imagem do espectrograma da gravação de USV mostrando os quatro subtipos analisados. A escala à esquerda mostra a frequência em kHz e a escala abaixo mostra o tamanho no espectro equivalente a 0,1 segundo. A primeira vocalização é do tipo *flat-call*, a segunda do tipo *trill*, a terceira *step-call* e a última uma *mixed*.

2.7. QUERCETINA E POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO

Como já citado, os portadores do THB apresentam uma elevação da atividade da PKC e uma elevação do estresse oxidativo nos neurônios. Dessa forma, um dos possíveis mecanismos do lítio, o principal estabilizador de humor utilizado, seria pela redução dos radicais livres e também pela inibição da PKC. Dessa forma, o flavonóide quercetina que atua como antioxidante e inibidor da PKC poderia agir como um estabilizador de humor, assim como o lítio. De acordo com Kanazawa et al. (2016), foi observado que a quercetina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção induzida por privação de sono REM em camundongos machos.

2.8. COMPARAÇÃO ENTRE MACHOS E FÊMEAS

A prevalência do uso exclusivo de machos como modelo animal para a pesquisa na área de neurociências é evidente, existindo poucos trabalhos comparando o resultado da pesquisa entre os sexos e menos ainda os que focam o estudo em fêmeas. Tal preferência é compreensível no caso de doenças onde existe maior prevalência de portadores masculinos, como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), dislexia e autismo. Contudo, mesmo em transtornos como depressão, ansiedade, pânico, anorexia e bulimia, que possuem maior prevalência em mulheres, a maioria dos estudos utilizam apenas machos como modelo (MCCARTHY et al., 2012). No THB não existe uma diferença na prevalência de portadores masculinos ou femininos, porém, existem diferenças na sintomatologia e curso da doença entre os sexos. As mulheres portadoras apresentam comorbidades diferentes, tendo maior índice de alterações tireoidianas, de peso, enxaqueca e ansiedade (PARIAL, 2015).

O motivo mais citado para a prevalência do uso de animais machos é a necessidade de reduzir variáveis, uma vez que o dimorfismo sexual é visível na expressão gênica, na morfologia, no comportamento e nos hormônios gonadais, variáveis estas que interagem com o sistema nervoso central. O dimorfismo é característico da espécie e pode levar a um resultado diferente entre os sexos na pesquisa. Mas isso é justamente um argumento para o uso das fêmeas, visto que também há dimorfismo em humanos, e que os efeitos sexuais são variáveis que co-

variam e são permanentes em qualquer resultado com fêmeas (JOEL & MCCARTHY, 2016).

Por fim, a utilização de ambos os sexos na pesquisa de novos fármacos na área da psiquiatria é muito importante, pois sabe-se que existem diferenças entre os animais e que se aplicam para os humanos, de forma que isso deixa a pesquisa mais próxima a realidade humana, facilitando assim a validação de resultados e maior entendimento das doenças.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos e fêmeas (34 machos e 38 fêmeas) pesando entre 200-300 g, provenientes do biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (60 X 25 X 25 cm), quatro 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 1116.

3.2. DROGAS

dl-Anfetamina (Sigma, EUA) – 2.5mg/kg, dissolvida em salina, foi administrada em dose única 10 min antes do teste, por via subcutânea (s.c.)

Quercetina (Sigma, EUA) – 20mg/kg, suspensa em 0.5% carboximetilcelulose (CMC), foi administrada dose única 25 min antes do teste, por via intraperitoneal (i.p.)

3.3. CRONOGRAMA EXPERIMENTAL E DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram separados em grupos de quatro animais por caixa e após uma semana de habituação, eles foram manipulados por cinco dias consecutivos (Figura 4), no intuito de evitar que a manipulação do pesquisador seja uma situação de estresse que comprometa o comportamento do animal.

Posteriormente, no primeiro e segundo dias, os animais passaram por uma primeira exposição ao teste de vocalização para que fosse 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), os que vocalizam medianamente (aproximadamente 40) e os que vocalizam muito (em média 70 vocalizações por minuto).

Os animais foram, então, separados entre quatro grupos, de acordo com a randomização estratificada (Tabela 1). Um primeiro grupo recebeu como tratamento CMC (veículo da quercetina) e salina como indutor, sendo um grupo controle, o segundo recebeu como tratamento quercetina (20mg/kg) e como indutor a salina, também entrando como grupo controle, o terceiro recebeu CMC como tratamento e anfetamina (2,5mg/kg) como indutor do estado maníaco e por fim o último grupo recebeu como tratamento a quercetina (20mg/kg) e como indutor a anfetamina (2,5mg/kg), grupo este que se esperava observar a reversão do estado maníaco.

		Fêmeas		Machos	
		Salina	Anfetamina	Salina	Anfetamina
CMC	Sal + CMC	Anf + CMC	Sal + CMC	Anf + CMC	
	N = 9	N = 10	N = 8	N = 9	
Quercetina	Sal + Que	Anf + Que	Sal + Que	Anf + Que	
	N = 9	N = 10	N = 8	N = 9	
Total		N = 38	Total	N = 34	

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais

Nos dias três e quatro foram feitas as habituações à manipulação, a caixa de testes e a manipulação com injeção intraperitoneal e subcutânea com salina. Por fim, no quinto dia foram realizados os testes comportamentais e no sexto a eutanásia (Figura 4).

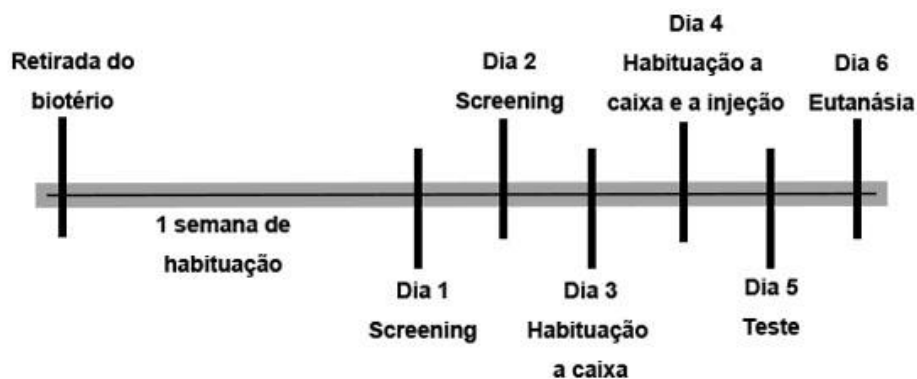


Figura 4: Esquema do cronograma dos dias do experimento

3.4. TESTES COMPORTAMENTAIS



Figura 5 :Esquema do delineamento do experimento no dia do teste.

3.4.1. Locomoção e exploração no campo aberto (Open Field)

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico (40 x 40 x 50 cm) em duas situações: uma durante a habituação e a outra no teste propriamente dito. No primeiro e segundo dia os animais foram expostos ao campo aberto forrado com cepilho por 20 minutos com a administração de salina intraperitonealmente e subcutaneamente para habituação a manipulação, já no dia do teste, os animais receberam 25 min antes uma dose única de Quercetina ou Veículo (CMC 0,5%) e após 15 min uma dose única de Anfetamina ou Salina. Após 10 min atividade locomotora e exploratória foi monitorada e analisada por 20 min. Para a análise da locomoção é feita a contagem de quantas vezes o animal cruza alguma linha que separa os quadrantes da caixa (Figura 6). Já para o comportamento exploratório foi contado a quantidade de *rearings* (comportamento em que o animal fica de pé nas duas patas traseiras).

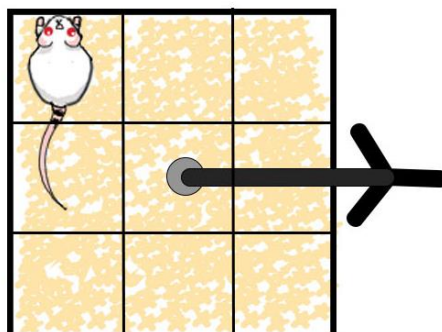


Figura 6: Ilustração de como é visualizado o teste de campo aberto e como é posicionado o microfone de gravação de USV.

3.4.2. Análise da Vocalização Ultrassônica de 50-kHz (USV)

Juntamente ao teste de locomoção e exploração foi gravado a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz, onde um microfone apropriado para captura de vocalização ultrassônica, o UltraSoundGate Condenser Microphone CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) foi colocado a 45 cm do chão. Este microfone é sensível a frequências entre 15-180 kHz, sendo que a vocalização do animal foi gravada pelo programa Avisoft RECORDER (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics) e posteriormente analisada. A gravação do áudio de cada animal foi transferida para o software Avisoft SASLab Pro (versão 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. Nessa análise foram avaliados os primeiros 20 segundos de cada minuto da gravação de 20 min do teste. Durante esses 20 segundos foram contadas o número de vocalizações e categorizado as vocalizações entre os quatro principais subtipos (*Flat-call*, *Trill*, *Step-call* ou *Mixed*).

3.4.3. Teste da Ponte de Arame Adaptado (Wire Beam Bridge - WBB)

O teste da ponte de arame adaptado (WBB) foi uma variação do teste proposto por Zhou et al (2015), para a avaliação de comportamento impulsivo, contudo nesse trabalho ele foi adaptado para avaliar o comportamento exploratório dos ratos Wistar logo após os testes locomoção e USV. O aparato para este teste consiste de uma caixa de madeira com uma de suas laterais abertas, posicionada a 60 cm de altura, e uma ponte

de arame também a 60cm de altura do chão, que conecte a lateral aberta desta caixa à uma parede. Uma plataforma pequena de 5x5 cm é posicionada em cima da ponte na ponta encostada na parede, no lado oposto da caixa de madeira (Figura 7) (BORTOLATO et al. 2009; ZHOU et al. 2015). No trabalho original, o animal era privado de comida previamente, então era colocado na caixa segura um pellet de alimento e o animal era colocado na plataforma na extremidade oposta. Uma vez que a ponte seria um ambiente aversivo e de risco, era medido o tempo de latência para o animal iniciar o movimento para chegar ao alimento, avaliando então a impulsividade do mesmo. No caso deste trabalho, o animal é colocado na caixa, tendo livre acesso a ponte e a plataforma e é gravado durante 5 minutos seu comportamento. Depois foi analisado o tempo explorando a ponte e o tempo que permaneceu na caixa e plataforma.

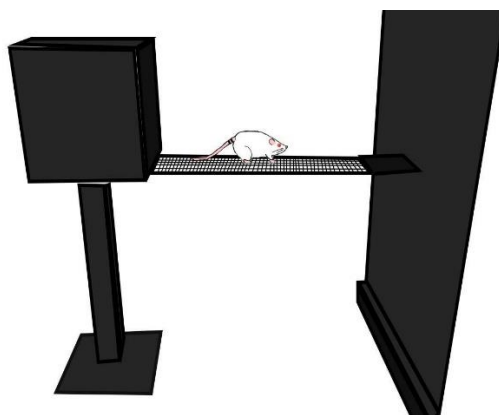


Figura 7: Ilustração do Teste da Ponte de Arame Adaptado (WBB). A esquerda está a caixa segura onde o animal é posicionado. A direita fica a pequena plataforma de apoio e entre as extremidades está a ponte de arame que o animal pode transitar.

3.4.4. Análises Estatísticas

Para os testes foram feitas análises de variância de duas vias (ANOVA) e com o Newman-Keuls como post-hoc caso resultado fosse significativo (com o $p < 0,05$) e um Teste T de Student para comparação do efeito da anfetamina entre machos e fêmeas. As análises foram feitas utilizando o software Statistica (versão 12; STATISTICA Enterprise Server) e os gráficos foram elaborados com o software GraphPad Prism (versão 7; GraphPad Software).

4.RESULTADOS

4.1.INDUÇÃO DO ESTADO DE MANIA

A anfetamina induziu aumento em machos na locomoção [Fator anfetamina: $F(1,30) = 23,048$, $p < 0,05$] (Figura 8), *Rearing* [Fator anfetamina: $F(1,30) = 27,350$, $p < 0,05$] (Figura 8), em vocalizações totais emitidas [Fator anfetamina: $F(1,30) = 6,004$, $p < 0,05$] (Figura 9), nas vocalizações tipo frequência modulada [Fator anfetamina: $F(1,28) = 5,743$, $p < 0,05$] (Figura 10), e no tempo de exploração da ponte no WBB [Fator anfetamina: $F(1,30) = 6,066$, $p < 0,05$] (Figura 11).

Para as fêmeas, a anfetamina também aumentou a locomoção [Fator anfetamina: $F(1,36) = 40,579$, $p < 0,05$], sendo a indução por anfetamina nesse parâmetro maior em fêmeas que em machos ($t_{17} = 2,73$, $p < 0,05$) (Figura 8). Também houve diferença significativa no *Rearing* [Fator anfetamina: $F(1,36) = 50,949$, $p < 0,05$](Figura 8), no total de vocalizações emitidas [Fator anfetamina: $F(1,36) = 8,043$, $p < 0,05$](Figura 9), em vocalizações tipo frequência modulada [Fator anfetamina: $F(1,36) = 6,360$, $p < 0,05$](Figura 10) e no tempo de exploração da ponte no WBB de forma significativa [Fator anfetamina: $F(1,33) = 4,732$, $p < 0,05$](Figura 11).

4.2.ANÁLISE DE LOCOMOÇÃO E EXPLORAÇÃO

Nos machos, houve um resultado significativo [Fator quercetina: $F(1,30) = 6,921$, $p < 0,05$; Interação: $F(1,30) = 4,819$, $p = 0,492$] do tratamento com quercetina na locomoção, com o post-hoc de Newman-Keuls mostrando que a anfetamina foi capaz de levar a um aumento da atividade locomotora em comparação ao grupo salina e que o tratamento com quercetina foi capaz de diminuir a locomoção induzida pela anfetamina. Acerca do *Rearing*, foi observado uma diferença significativa [Fator Quercetina: $F(1,30) = 9,830$, $p < 0,05$; Interação: $F(1,30) = 0,3128$, $p = 0,580$] do tratamento com quercetina (Figura 8), com o post-hoc mostrando que a anfetamina foi capaz de aumentar a atividade exploratória em comparação ao grupo salina e que o tratamento com quercetina foi capaz de reduzir a exploração induzida pela anfetamina.

Já em fêmeas, o resultado não foi significativo [Fator quercetina: $F(1,36) = 0,032$, $p = 0,857$; Interação: $F(1,36) = 0,112$, $p = 0,7397$] do tratamento com quercetina para a

redução da locomoção induzida por anfetamina. O post-hoc demonstrou que a indução com anfetamina foi diferente do controle com salina, já o tratamento com quercetina não alterou a locomoção dos grupos induzidos com anfetamina. Porém para o *Rearing* foi observada uma diferença significativa [Fator quercetina: $F(1,36)=18,101$, $p < 0,05$; Interação: $F(1,36)= 1,635$, $p = 0,209$] para o tratamento com quercetina (Figura 8), com o post-hoc mostrando que a anfetamina foi capaz de aumentar a atividade exploratória em comparação ao grupo salina e que o tratamento com quercetina foi capaz de reduzir a exploração induzida pela anfetamina.

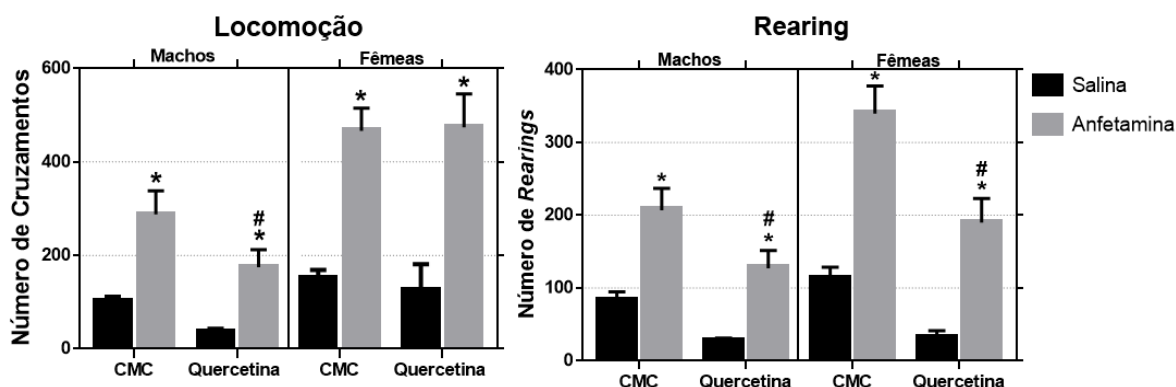


Figura 8 Gráficos dos resultados da Locomoção e do *Rearing*. Ambos gráficos estão divididos com os resultados dos machos à esquerda e das fêmeas à direita, as barras representam as médias com o erro padrão da média, as marcações representam * = $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina e # = $p < 0,05$ em comparação ao grupo anfetamina com CMC. Machos $n = 8$ nos grupos Salina e $n = 9$ grupos Anfetamina, fêmeas $n = 9$ nos grupos Salina e $n = 10$ nos grupos Anfetamina.

4.3. ANÁLISE DE VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA (USV) DE 50-KHZ

Nos machos, não houve diferença significativa [Fator quercetina: $F(1,30)= 0,028$, $p = 0,866$; Interação: $F(1,30)= 0,019$, $p = 0,888$] para o tratamento com quercetina em relação ao total de vocalizações emitidas.(Figura 9). O post-hoc demonstrou que a anfetamina aumentou o número total de emissões em comparação ao grupo salina, porém o tratamento com quercetina não foi capaz de reduzir o aumento devido a indução por anfetamina. No subtipo *trill* de USV, a ANOVA não demonstrou diferença significativa [Fator quercetina: $F(1,30)= 3,468$, $p = 0,0723$; Interação: $F(1,30)= 2,637$, $p = 0,114$] para o tratamento com quercetina (Figura 10), contudo, o post-hoc demonstrou que o

tratamento com quercetina no grupo anfetamina foi diferente do grupo anfetamina sem o tratamento ($p = 0,019$).

Já para as fêmeas, também não houve diferença significativa [$F(1,36) = 0,401$, $p = 0,5303$] para o total de vocalizações emitidas com o tratamento de quercetina, assim como entre os subtipos de USV (Figura 9). O post-hoc de ambos os testes demonstrou que os grupos anfetamina foram diferentes dos grupos salinas, já o tratamento com quercetina não apresentou diferença.

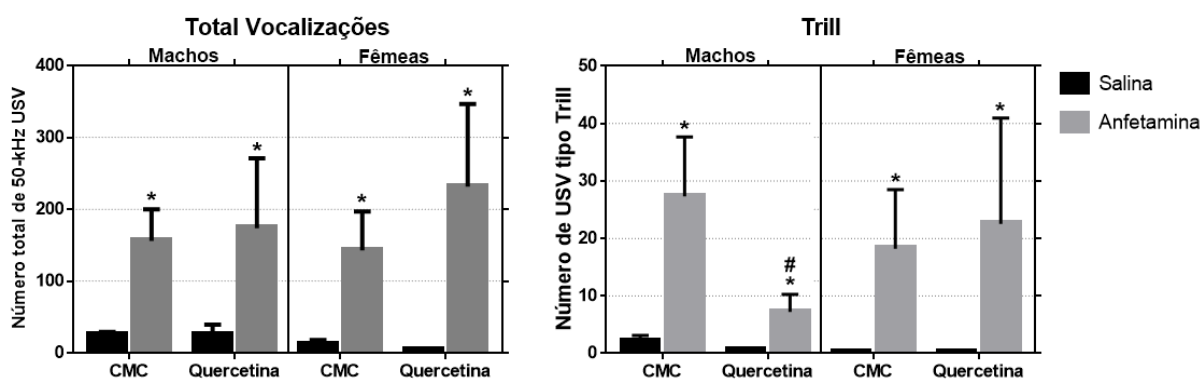


Figura 9: Gráficos dos resultados do total de vocalizações(esquerda) e do subtipo *Trill* (direita). Ambos gráficos estão divididos com os resultados dos machos à esquerda e das fêmeas à direita, as barras representam as médias com o erro padrão da média, as marcações representam * = $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina e # = $p < 0,05$ em comparação ao grupo anfetamina com CMC. Machos $n = 8$ no grupo Salina + CMC, $n = 7$ no grupo Salina + Quercetina, $n = 9$ no grupo Anfetamina + CMC e $n = 8$ no grupo Anfetamina + Quercetina. Fêmeas $n = 9$ nos grupos Salina e $n = 10$ nos grupos Anfetamina

Sobre o padrão de distribuição dos subtipos de vocalização (Figura 10), entre os grupos de machos, os animais do grupo salina (CMC e quercetina) possuíam um padrão semelhante, já os animais tratados com anfetamina, o padrão de distribuição das FM foi diferente, dando destaque a redução do subtipo *trill* com o tratamento com quercetina.

Já nas fêmeas, o padrão foi diferente entre todos os grupos. Dentro dos grupos salina, o tratamento com quercetina reduziu de forma geral as FM. E entre os grupos anfetamina, o subtipo *trill* aumentou nos animais que receberam quercetina em comparação aos que receberam CMC (22% e 11% respectivamente).

Por fim, foi observada a emissão de vocalizações aversivas em dois animais machos, um animal do grupo [salina + quercetina] e um do grupo [anfetamina + quercetina], que de acordo com Knutson (2002), essas vocalizações aparentam estar relacionadas com estado de afeto negativo. Devido as vocalizações serem predominantemente aversivas nestes animais, a avaliação de USV dos mesmos não foram incluídas nas análises.

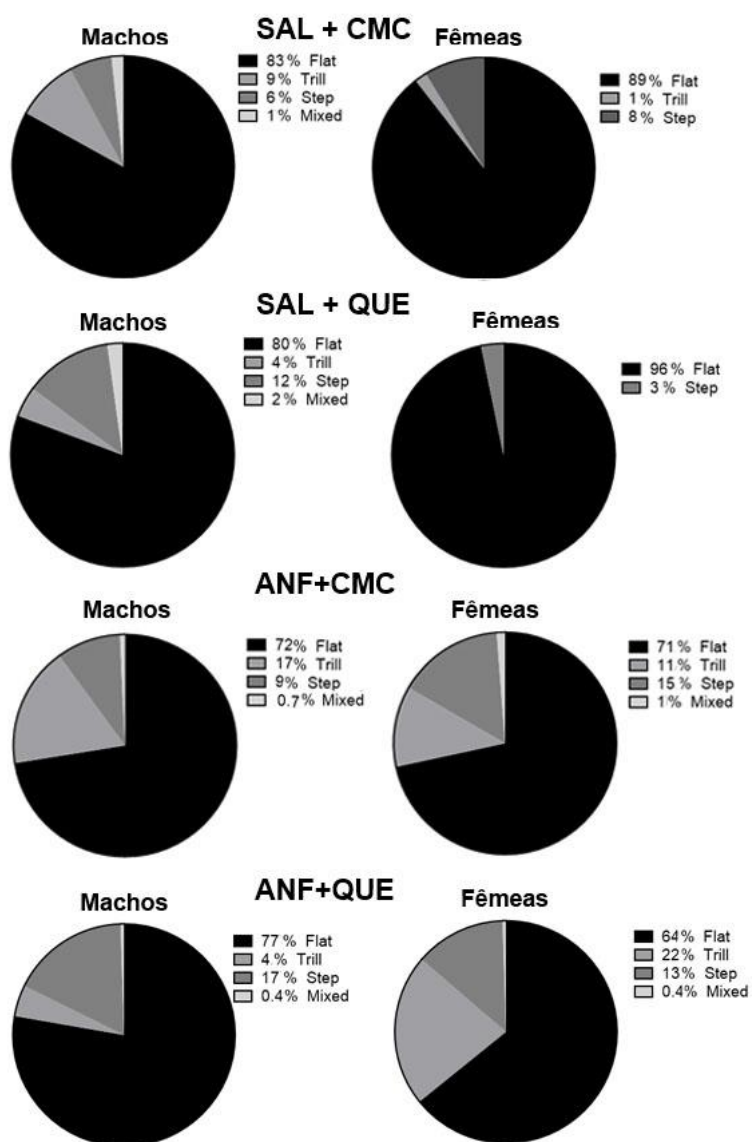


Figura 10: Gráficos das porcentagens de da distribuição de cada subtipo de USV emitido entre os grupos experimentais, sendo os gráficos à direita dos machos e à esquerda das fêmeas; Machos n = 8 no grupo Salina + CMC, n = 7 no grupo Salina + Quercetina, n = 9 no grupo Anfetamina + CMC e n = 8 no grupo Anfetamina + Quercetina. Fêmeas n = 9 nos grupos Salina e n = 10 nos grupos Anfetamina.

4.4. ANÁLISE DO TESTE DA PONTE DE ARAME (WBB)

Para os machos, na análise não houve um resultado significativo [Fator quercetina: $F(1,30) = 0,005$, $p = 0,940$; Interação: $F(1,30) = 0,074$, $p = 0,787$] para o tratamento de quercetina nos animais tratados com anfetamina, mantendo o padrão de maior permanência na ponte e menor permanência na caixa (Figura 11).

Para as fêmeas, também não houve um resultado significativo [Fator quercetina: $F(1,33) = 0,4855$, $p = 0,490$; Interação: $F(1,33) = 0,001$, $p = 0,982$] para o tratamento de quercetina nos animais tratados com anfetamina, mantendo o padrão de maior permanência na ponte e menor permanência na caixa (Figura 11).

Tanto para machos quanto para fêmeas, o post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que indução com anfetamina levou a um maior tempo de exploração da ponte em relação ao grupo salina, já o tratamento com quercetina não foi diferente entre os grupos induzidos por anfetamina.

Além disso, alguns animais (quatro fêmeas e um macho) tratados com anfetamina pularam da ponte de arame durante o teste, não tendo então uma avaliação desses animais neste teste.

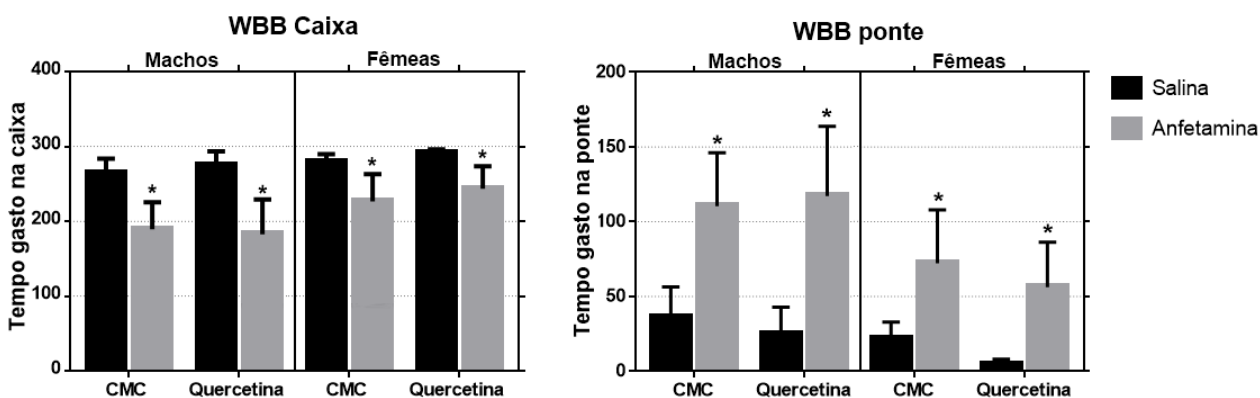


Figura 11: Gráficos dos resultados do teste da ponte de arame (WBB) do tempo permanecido na caixa(esquerda) e na ponte (direita). Ambos gráficos estão divididos com os resultados dos machos à esquerda e das fêmeas à direita, as barras representam as médias com o erro padrão da média, as marcações representam $* = p < 0,05$ em comparação ao grupo salina. Machos $n = 8$ nos grupos Salina, $n = 9$ grupo Anfetamina + Quercetina e $n = 8$ grupo Anfetamina + CMC. Fêmeas $n = 9$ no grupo Salina + Quercetina, $n = 8$ para o grupo Salina + CMC e para o grupo Anfetamina + Quercetina, por fim $n = 7$ para o grupo Anfetamina + CMC.

5. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo utilizando anfetamina em fêmeas que observou diferença sexual em parâmetros comportamentais relacionados à mania. Em machos, já foi observado o aumento da locomoção e aumento de emissões USV de 50-kHz, porém não em fêmeas. A anfetamina foi capaz de levar a alterações comportamentais em todos os parâmetros analisados em ambos os sexos.

O tratamento com a quercetina foi capaz de reduzir a hiperlocomoção nos ratos machos, como observado para camundongos (KANAZAWA et al. 2016; KANAZAWA et al. 2017). Nesses estudos, a mania foi induzida por privação de sono REM e metilfenidato (respectivamente), e quando tratados com quercetina, observou-se a redução na hiperlocomoção. A reprodução do resultado entre machos de espécies diferentes é então um importante registro.

O tratamento com quercetina pode não ter alterado o parâmetro das USV no total de emissões como mostrado por Pereira *et al* (2014) com o tratamento por lítio, porém ele reduziu significativamente o total de emissões do subtipo *trill* nos machos, o que pode estar relacionado com uma redução da hiperlocomoção, uma vez que esse subtipo está potencialmente mais relacionado à comportamentos como andar, correr e virar (BURKE et al, 2017).

As fêmeas apresentaram uma maior sensibilidade à indução na atividade locomotora em relação aos machos. Contudo, acerca do tratamento, nas fêmeas foi observado que os animais [Anf + Que] tiveram a locomoção semelhante a [Anf + CMC]. Em contraste, foi observada uma redução do *rearing* nos animais [Anf + Que], e aumento da emissão da emissão do subtipo *trill* (22% para [Anf + Que] e 11% para [Anf + CMC]).

O teste da ponte de arame (WBB) original não se mostrou um teste adequado para a avaliação de impulsividade neste trabalho, pois foi testado previamente a metodologia original e não foi possível avaliar a impulsividade pela latência, uma vez que a ponte não se mostrou aversiva o suficiente e os animais a exploravam mesmo sem o estímulo alimentar. Além disso a principal dificuldade técnica foram os animais pulando ou caindo da estrutura, reduzindo o número amostral. Ainda que a anfetamina seja capaz de levar a um aumento do tempo de exploração da ponte em relação aos animais controle, o teste não está totalmente padronizado, não sendo possível afirmar a validade

dos resultados obtidos. Para a avaliação de impulsividade, exploração e ansiedade, testes como o labirinto em T ou em cruz elevado poderiam levar a uma avaliação mais completa e adequada desses parâmetros.

Em suma, os testes do campo aberto e de análise das emissões de USV a 50-kHz foram bons para a avaliação do comportamento tipo maníaco. Já para a medida de impulsividade, seria necessário fazer a substituição para outros testes mais adequados, como o teste do labirinto em T ou em cruz elevado. Além disso, como o estado maníaco é complexo e possui diversas características, os testes de novos fármacos anti-maníacos devem explorar outros comportamentos, não apenas a hiperlocomoção.

De forma geral, os resultados foram diferentes em machos e fêmeas, de forma que o tratamento não pode ser considerado eficaz para ambos os sexos na dose escolhida, demonstrando que não se pode extrapolar o resultado em machos para as fêmeas, necessitando assim sempre estudá-las em conjunto com os machos para uma avaliação completa da eficácia de um fármaco.

6. CONCLUSÃO

A anfetamina é capaz de induzir o estado maníaco em machos e fêmeas, elevando os parâmetros comportamentais de hiperlocomoção, exploração, aumento da emissão total de vocalizações USV de 50-kHz e a emissão de USV tipo frequências moduladas. Porém, a quercetina não foi capaz de atenuar essas elevações em machos e em fêmeas na mesma forma: houve em machos uma redução da hiperlocomoção, exploração e emissão de USV do subtipo *trill*, já as fêmeas apenas a exploração foi reduzida significativamente.

Ainda, esse trabalho conclui que é necessário incluir outros parâmetros além da hiperlocomoção para a análise de novas drogas anti-maníacas, incluindo também o uso de fêmeas nas análises.

REFERÊNCIAS

ASHOK, A H et al. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.666-679, 14 mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2017.16>.

BURKE, Candace J. et al. Specific 50-kHz vocalizations are tightly linked to particular types of behavior in juvenile rats anticipating play. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.1-20, 3 maio 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0175841>.

COSGROVE, Victoria E.; KELSOE, John R.; SUPPES, Trisha. Toward a valid animal model of bipolar disorder: how the research domain criteria help bridge the clinical-basic science divide. **Biological Psychiatry**, California, v. 79, n. 1, p.62-70, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.09.002>.

COUSINS, David A; BUTTS, Kelly; YOUNG, Allan H. The role of dopamine in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, Newcastle, v. 11, n. 2009, p.787-806, ago. 2009.

EISNER, Lori R. et al. Simplifying profiles of comorbidity in bipolar disorder. **Journal Of Affective Disorders**, [s.l.], v. 220, p.102-107, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2017.05.045>.

ENGELHARDT, K.-Alexander et al. Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. **European Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.261-273, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.003>.

HEAL, David J et al. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. **Journal Of Psychopharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.479-496, 28 mar. 2013. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0269881113482532>.

JOEL, Daphna, MCCARTHY, Margaret M , Incorporating sex as a biological variable in neuropsychiatric research: where are we now and where should we be?, **Neuropsychopharmacology** accepted article preview 31 May 2016; doi: 10.1038/npp.2016.79.

KANAZAWA, Luiz K.s. et al. Effects of acute and chronic quercetin administration on methylphenidate-induced hyperlocomotion and oxidative stress. **Life Sciences**, Curitiba, v. 171, p.1-8, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.01.007>.

KATO, Tadafumi. Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. **Schizophrenia Research**, Hirose, v. 187, p.62-66, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2016.10.037>.

KNUTSON, Brian; BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological Bulletin**, [s.l.], v. 128, n. 6, p.961-977, 2002. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037//0033-2909.128.6.961>.

LOGAN, R.w.; MCCLUNG, C.a.. Animal models of bipolar mania: The past, present and future. **Neuroscience**, [s.l.], v. 321, p.163-188, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.041>.

MCCARTHY, Margaret M. et al. Sex differences in the brain: the not so inconvenient truth. **J Neurosci**, [s.l.], v. 7, n. 32, p.2241-2247, ago. 2012.r

MILLER, Thomas H.. Bipolar Disorder. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.269-284, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2016.02.003>.

PARIAL, Sonia. Bipolar disorder in women. **Indian Journal Of Psychiatry**, [s.l.], v. 57, n. 6, p.252-263, 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0019-5545.161488>.

PEREIRA, Marcela et al. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania?. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 231, n. 13, p.2567-2577, 11 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-013-3413-1>.

WENDLER, Etieli et al. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 26, n. 12, p.1900-1908, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.10.012>.

ZHOU, Zhu et al. Chronic treatment with mood stabilizer lithium inhibits amphetamine-induced risk-taking manic-like behaviors. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 603, p.84-88, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.027>.