

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA POZZETTI SIBA

ESTRESSE CRÔNICO COMO MODELO NO ESTUDO DE TRANSTORNOS
TIREOIDIANOS COMÓRBIDOS A ALTERAÇÕES DE HUMOR: DIMORFISMO
SEXUAL COMPORTAMENTAL.

CURITIBA

2022

ISADORA POZZETTI SIBA

ESTRESSE CRÔNICO COMO MODELO NO ESTUDO DE TRANSTORNOS
TIREOIDIANOS COMÓRBIDOS A ALTERAÇÕES DE HUMOR: DIMORFISMO
SEXUAL COMPORTAMENTAL.

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção de título de Doutora, curso de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Roberto Andreatini
Co-orientador(a): Marcela Pereira

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Siba, Isadora Pozzetti

Estresse crônico como modelo no estudo de transtornos tireoidianos comórbidos a alterações de humor : dimorfismo sexual comportamental / Isadora Pozzetti Siba. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Orientador: Roberto Andreatini.
Coorientadora: Marcela Pereira.

1. Estresse psicológico. 2. Depressão. 3. Mania. 4. Glândula tireóide - Doenças. 5. Dimorfismo sexual. I. Andreatini, Roberto, 1961-. II. Pereira, Marcela. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de junho de dois mil e vinte e dois às 09:30 horas, na sala Anf da Farmacologia, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **ISADORA POZZETTI SIBA**, intitulada: ***Estresse crônico como modelo no estudo de transtornos tireoidianos comórbidos a alterações de humor: dimorfismo sexual comportamental***, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO ANDREATINI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ROBERTO ANDREATINI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA), JANAÍNA MENEZES ZANOVELI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutora está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ROBERTO ANDREATINI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 29 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 18:33:29.0
ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 16:17:56.0
AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 16:04:55.0
JANAÍNA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 11:17:26.0
BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ISADORA POZZETTI SIBA** intitulada: ***Estresse crônico como modelo no estudo de transtornos tireoidianos comórbidos a alterações de humor: dimorfismo sexual comportamental***, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO ANDREATINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 29 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 18:33:29.0
ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 16:17:56.0
AMANDA LEITE BASTOS PEREIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 16:04:55.0
JANAÍNA MENEZES ZANOVELI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
30/06/2022 11:17:26.0
BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Agradecimentos

Serei eternamente grata...

A minha família, por todo apoio e suporte que sempre proporcionaram.

Ao professor Roberto, por ser um excelente orientador, que sempre prestou todo apoio necessário para execução da minha pesquisa. Ainda mais, agradeço por todo o aprendizado que me foi provido não somente o Doutorado, mas durante toda em toda minha jornada na pesquisa científica.

Sou grata também a Marcela, que além de ser uma das melhores amigas que a vida me deu, sempre me ajudou no meu trabalho, não importa a distância.

Sou grata à professora Janaína, que me orientou durante o Mestrado e me proporcionou grande aprendizado.

Agradeço a professora Alexandra pela disposição e paciência para coletar as amostras de sangue dos animais, sem sua ajuda, uma parte da pesquisa não seria possível.

Agradeço à Camila, Tiago e Diego, que foram parceiros de trabalho, e que sem a ajuda deles, boa parte do trabalho não teria sido possível.

A todos os colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, todos sempre foram muito solícitos e me ajudaram muito, cada um a sua maneira.

Aos amigos, pelos momentos de diversão e descontração.

Aos camundongos utilizados no estudo, pois sem eles, a pesquisa nesta área seria muito limitada.

Agradeço a todos que fizeram parte deste trabalho, de alguma maneira.

“O primeiro pecado da humanidade foi a fé; a primeira virtude foi a dúvida.”

Carl Sagan

RESUMO

O estresse é frequentemente documentado como um gatilho para diversos transtornos psiquiátricos, dentre eles a depressão. Tais condições são multifatoriais e variáveis entre os indivíduos, refletindo nas diferenças observadas nos sintomas e na resposta aos tratamentos. Nesta linha, a análise da expressão diferencial do RNA é uma ferramenta que pode auxiliar na elucidação de marcadores moleculares específicos presentes nas diversas apresentações da doença, exibindo novos possíveis alvos para tratamentos mais eficazes, além de direcionar novas teorias para mecanismos. Para este fim, utilizamos o modelo de estresse crônico brando repetido e induzido (ECBRI), um modelo com boa validade de face, preditiva e de constructo, a fim de se analisar o transcriptoma em animais controle *versus* anedônicos. No entanto, boa parte dos animais submetidos ao protocolo de estresse não apresentaram anedonia, e através de análise individual da preferência de sacarose individual de cada animal, notamos que parte destes mantinham a mesma preferência de sacarose (refratários/ resilientes), alguns diminuíram a preferência (anedônicos) e uma parcela dos animais aumentaram o consumo de sacarose (maníaco) após estresse, sendo tal comportamento hedônico elevado relacionado a comportamento maníaco. Além disto, a expressão diferencial de genes entre cada grupo (análise em pares) apontou para envolvimento de diversas cascatas de sinalização, mas ênfase foi dada à alteração na expressão do gene *prepro-Trh*, envolvido na atividade tireoidiana. Os hormônios tireoidianos (HT), conhecidos como triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) desempenham um papel essencial em diversos processos no sistema nervoso central, bem como no crescimento, diferenciação celular e metabolismo. Estudos frequentemente relatam que distúrbios nos níveis de HT acarretam alterações na homeostase do SNC e, conseqüentemente, no humor e na cognição. Diversos dados humanos e não humanos mostraram uma associação bidirecional entre comportamento do tipo depressivo e anormalidades nos níveis de HT. Embora as mulheres sejam mais afetadas do que os homens em ambos os distúrbios, existem poucos estudos pré-clínicos com modelos animais abrangendo ambos os sexos, e menos é encontrado quando se avalia a associação entre distúrbios de HT e comportamento do tipo depressivo. Ainda mais, o comportamento tipo-maníaco e disfunções tireoidianas é pouco documentado, sendo mais um ponto importante a ser analisado. Assim, a segunda fase do estudo consistiu em analisar comportamentalmente camundongos Swiss (em testes de depressão e ansiedade) de ambos os sexos submetidos ao ECBRI e a modelos de disfunção tireoidiana. Nossos dados demonstram dimorfismo sexual em alguns parâmetros comportamentais que indicam comportamento tipo-depressivo (mais presente em machos) e comportamento tipo-maníaco (mais presente em fêmeas). Ainda mais, a quantificação de T4 livre demonstrou possíveis diferenças sexuais quanto à atividade tireoidiana no modelo de indução de hipertireoidismo. Apesar dos modelos de disfunção tireoidiana não apresentarem a eficácia esperada em nossos animais, alterações comportamentais relacionadas aos tratamentos foram observadas. Por fim, o presente estudo abre caminhos para nova abordagem do ECBRI, além de pontuar a importância da atividade tireoidiana com transtornos de humor.

Palavras-chave: Estresse crônico, depressão, mania, disfunção tireoidiana, dimorfismo sexual.

ABSTRACT

Stress is often documented as a trigger for several psychiatric disorders, including depression. Such conditions are multifactorial and variable between individuals, reflecting the differences observed in symptoms and in the response to treatments. In this line, the analysis of differential RNA expression is a tool that can help to elucidate specific molecular markers present in the different presentations of the disease, showing new possible targets for more effective treatments, in addition to directing new theories for mechanisms. To this end, we used the induced chronic unpredictable mild stress (CUMS) model, that has good face, predictive and construct validity, in order to analyze the transcriptome in control *versus* anhedonic animals. However, most of the animals submitted to the stress protocol did not show anhedonia, and through individual analysis of the sucrose preference of each animal, we noticed that part of them maintained the same sucrose preference (refractory/resilient), some decreased the preference (anhedonic) and a portion of the animals increased sucrose consumption after stress (maniac), and such high hedonic behavior is related to manic behavior. Furthermore, the differential expression of genes between each group (pair analysis) pointed to the involvement of several signaling cascades, but emphasis was given to the alteration in the expression of the prepro-Trh gene, involved in thyroid activity. Thyroid hormones (TH), known as triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) play an essential role in several processes in the central nervous system, as well as in growth, cell differentiation and metabolism. Studies often report that disturbances in TH levels lead to changes in CNS homeostasis and, consequently, in mood and cognition. Several human and non-human data have shown a bidirectional association between depressive-like behavior and abnormalities in TH levels. Although women are more affected than men in both disorders, there are few preclinical studies with animal models covering both sexes, and less is found when evaluating the association between TH disorders and depressive-like behavior. Even more, the manic-like behavior and thyroid dysfunctions is poorly documented, being another important point to be analyzed. Thus, the second phase of the study consisted of behaviorally analyzing Swiss mice of both sexes submitted to ECBRI and thyroid dysfunction models. Our data demonstrate sexual dimorphism in some behavioral parameters that indicate depressive-like behavior (more present in males) and manic-like behavior (more present in females). Furthermore, measurement of free T4 exhibited possible sex differences regarding thyroid activity in the hyperthyroidism induction model. Although the thyroid dysfunction models did not show the expected efficacy in our animals, behavioral changes related to the treatments were observed. Finally, the present study presents a new approach to ECBRI, in addition to pointing out the importance of thyroid activity with mood disorders.

Keywords: Chronic stress, depression, mania, thyroid dysfunction, sexual dimorphism.

Lista de figuras

- Análise RNAseq

Figura 1: Preferência de sacarose baseado na primeira divisão dos grupos, com uma abordagem tradicional de distribuição (anedonia = diminuição de consumo; refratário: ausência de mudança).....46

Figura 2: Preferência de sacarose baseado na segunda divisão dos grupos, com uma nova abordagem de distribuição (anedonia, refratariedade, mania).....47

Figura 3: Exemplo dos resultados obtidos com Agilent em leitura de RNA.....48

Figura 4: Distribuição das amostras com base em taxa de similaridade.....50

Figura 5: Análise PCA da distribuição dos diferentes grupos usados na análise.....52

Figura 6: Enrichment analysis para animais controle versus anedônicos.....54

Figura 7: Análise das conexões entre cascatas biológicas diferencialmente ativadas quando comparados animais controle e anedônicos.....55

Figura 8: Enrichment analysis para animais controle versus maníacos.....56

Figura 9: Análise das conexões entre cascatas biológicas diferencialmente ativadas quando comparados animais controle versus maníacos.....57

Figura 10: Enrichment analysis para animais refratário versus maníacos.....58

Figura 11: Análise das conexões entre cascatas biológicas diferencialmente ativadas quando comparados animais refratário versus maníacos.....59

Figura 12: Análise da expressão diferencial de genes quando comparados animais maníacos versus anedônicos.....61

- ECBRI em camundongos Swiss machos e fêmeas

Figura 13: Preferência de sacarose em machos antes (basal) e após (final) ao ECBRI, com nova abordagem de distribuição.....63

Figura 14: Preferência de sacarose em fêmeas antes (basal) e após (final) ao teste de ECBRI, com nova abordagem de distribuição.....64

Figura 15: Preferência de sacarose comparando os gêneros, com nova abordagem de distribuição.....64

Figura 16: Teste do ninho em machos após o modelo de ECBRI.....65

Figura 17: Teste do ninho em fêmeas após o modelo de ECBRI.....65

Figura 18: Teste do ninho em todos os animais, sem fator sexo.....66

Figura 19: Escala de pelo em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....66

Figura 20: Escala de pelo em fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....67

<u>Figura 21:</u> Escala de pelo em machos e fêmeas.....	67
<u>Figura 22:</u> Tempo de imobilidade (T imob) no TNF em machos e fêmeas.....	68
<u>Figura 23:</u> N° de escaladas no TNF em machos e fêmeas.....	68
<u>Figura 24:</u> T imob (A) e N° de escaladas (B) no TNF de camundongos Swiss machos e fêmeas.....	69
<u>Figura 25:</u> Taxa de locomoção sem analisar o fator sexo, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	70
<u>Figura 26:</u> Taxa de locomoção em fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	70
<u>Figura 27:</u> Taxa de locomoção em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	71
<u>Figura 28:</u> Teste de Esconder Esferas: n° de esferas escondidas (Esf esc) em machos e fêmeas.....	71
<u>Figura 29:</u> Labirinto em Cruz Elevado (LCE): % de entradas nos Braços Abertos (BA) de camundongos machos e fêmeas após o modelo de ECBRI.....	72
<u>Figura 30:</u> Labirinto em Cruz Elevado (LCE): N° de entradas nos Braços Fechados (BF) no teste do LCE em machos e fêmeas após o modelo de ECBRI.....	72
<u>Figura 31:</u> Análise peso em machos, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI).....	73
<u>Figura 32:</u> Análise peso em femeas, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI).....	73
<u>Figura 33:</u> Análise peso em machos e fêmeas após o modelo de ECBRI.....	74
• Modelo de indução ao hipertireoidismo	
<u>Figura 34:</u> Preferência de sacarose de camundongos Swiss machos submetidos ao ECBRI.....	34
<u>Figura 35:</u> Preferência de sacarose de camundongos Swiss fêmeas submetidos ao ECBRI.....	35
<u>Figura 36:</u> Teste do ninho de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao ECBRI.....	76
<u>Figura 37:</u> Escala de pelo em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	77
<u>Figura 38:</u> Escala de pelo em camundongos Swiss femeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	77
<u>Figura 39:</u> Escala de pelo em camundongos Swiss machos e. femeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	78

<u>Figura 40:</u> T imob (A) e N° de escaladas (B) no Teste de Natação Forçada (TNF) em machos e fêmeas ao final do ECBRI.....	78
<u>Figura 41:</u> Locomoção (número de interrupções) de camundongos Swiss fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	79
<u>Figura 42:</u> Locomoção em camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com veículo (PBS) ou T4 submetidos modelo de ECBRI.....	79
<u>Figura 43:</u> Locomoção de camundongos Swiss fêmeas e machos tratados com veículo (PBS) ou T4 antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI.....	80
<u>Figura 44:</u> Teste de Marble-burying: N° de esferas escondidas por camundongos Swiss machos e fêmeas.....	80
<u>Figura 45:</u> Labirinto em Cruz Elevado: % de tempo nos braços abertos (BA) de camundongos Swiss (machos e fêmeas) conforme a classificação pela preferência de sacarose.....	81
<u>Figura 46:</u> Análise semanal de peso em camundongos Swiss machos submetidos ao modelo de ECBRI tratados com veículo (PBS) ou T4.....	81
<u>Figura 47:</u> Análise peso em fêmeas, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI).....	82
<u>Figura 48:</u> Análise peso (em gramas) de camundongos Swiss fêmeas tratadas com veículo (PBS) ou T4 submetidas ao ECBRI), basal (antes do ECBRI) e final (após o ECBRI).....	82
<u>Figura 49:</u> Análise peso de camundomngos Swiss machos e fêmeas tratados com veículo (PBS) ou T4 submetidos ao ECBRI).....	82
• Modelo de indução ao hipotireoidismo	
<u>Figura 50:</u> Preferência de sacarose em camundongos Swiss machos eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI.....	83
<u>Figura 51:</u> Preferência de sacarose em camundongos Swiss fêmeas eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI.....	84
<u>Figura 52:</u> Preferência de sacarose (em raiz quadrada) de camundongos Swiss machos e fêmeas conforme a classificação em resposta ao ECBRI (Medida final, após ECBRI).....	84
<u>Figura 53:</u> Teste do ninho de camundongos Swiss fêmeas classificadas pela resposta ao ECBRI (classificação pela preferência de sacarose).....	85
<u>Figura 54:</u> Escala de pelo de camundongos Swiss machos eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI.....	85
<u>Figura 55:</u> Escala de pelo de camundongos Swiss fêmeas eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI.....	86
<u>Figura 56:</u> Escala de pelo de camundongos Swiss machos e fêmeas eutireóides (PBS) e hipotireóides (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI.....	86

<u>Figura 57:</u> Tempo de imobilidade - T imob (A) e N° de escaladas (B) no Teste de Natação Forçada (TNF) de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutiroideos (PBS) e hipotiroideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI.....	87
<u>Figura 58:</u> Caixa de atividade locomotora: Locomoção de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutiroideos (PBS) e hipotiroideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI.....	87
<u>Figura 59:</u> Locomoção de camundongos Swiss machos eutiroideos (PBS) e hipotiroideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI classificados de acordo com a preferência de sacarose final.....	88
<u>Figura 60:</u> Locomoção de camundongos Swiss machos e fêmeas eutiroideas (PBS) e hipotiroideas (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI classificados de acordo com a preferência de sacarose final.....	88
<u>Figura 61:</u> Teste de Esconder Esferas: N° de esferas escondidas de camundongos machos vs. fêmeas.....	89
<u>Figura 62:</u> Labirinto em Cruz Elevado: % de tempo nos Braços Abertos (BA) de camundongos Swiss machos eutireoideos e hipotireoideos submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI.....	89
<u>Figura 63:</u> Comportamento no Labirinto em Cruz Elevando de camundongos Swiss fêmeas eutireoideas (PBS) e hipotireoideas (HIPO) submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI.....	90
<u>Figura 64:</u> Labirinto em Cruz Elevando: % de tempo nos Braços Abertos (BA) de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutireoideos e hipotireoideos submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI.....	90
<u>Figura 65:</u> Análise do peso de camundomngos Swiss (machos e fêmeas) eutireoideos (PBS) e hipotireoideos (HIPO) submetidos ao ECBRI.....	91

Lista de tabelas

<u>Tabela 1:</u> Resumo dos resultados de controle de qualidade.....	49
<u>Tabela 2:</u> Número de genes diferencialmente expressos nos diferentes grupos.....	53
<u>Tabela 3:</u> Levantamento de funções de genes expressos diferencialmente entre animais maníacos e anedônicos.....	60
<u>Tabela 4:</u> Níveis séricos de T3 total (TT3) e T4 livre (FT4) em machos tratados com PBS (controle), T4 (hipertireoidismo) e MMI (hipotireoidismo).....	92
<u>Tabela 5:</u> Níveis séricos de T3 total (TT3) e T4 livre (FT4) em fêmeas tratadas com PBS (controle), T4 (hipertireoidismo) e MMI (hipotireoidismo).....	92
<u>Tabela 6:</u> Distribuição de machos e fêmeas expostos apenas ao ECBRI entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).....	92
<u>Tabela 7:</u> Distribuição de machos e fêmeas expostos ao ECBRI e submetidos ao tratamento para indução de hipertireoidismo, entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).	93
<u>Tabela 8:</u> Distribuição de machos e fêmeas expostos ao ECBRI e submetidos ao tratamento para indução de hipotireoidismo, entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).....	93

Lista de abreviaturas

5-HT - Serotonina

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

DA - Dopamina

DAT - Transportador de dopamina

Dio1 - Deiodinase tipo 1

Dio2 - Deiodinase tipo 2

Dio3 - Deiodinase tipo 3

ECBRI - Estresse crônico brando repetido e imprevisível

ER - Receptor estrogênio

FT4 - Tiroxina livre

GABA - Ácido gama-aminobutírico

Glu - Glutamato

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

HPT - Hipotálamo-pituitária-tireóide

HT - Hormônios tireoidianos

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

MMI - Metimazol

NA - Noradrenalina

NAcc - Núcleo accumbens

RNA - Ácido ribonucleico

PLC - Fosfolipase C

PFC - Córtex pré-frontal

PKC - Proteína quinase C

prepro-Trh - mRNA do hormônio liberador de tireotrofina

RHTs - Receptores de hormônios tireoidianos

SNC - Sistema nervoso central

T3 - Triiodotironina

T4 - Tiroxina

TBG - Globulina ligadora de tiroxina

TT3 - Triiodotironina total

TDM - Transtorno depressivo maior

THB - Transtorno de humor bipolar

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRH - Hormônio liberador de tireotrofina

TSH - Hormônio tireoestimulante

TTR - Transtirretina

VDR - Receptor de vitamina D

vmPFC - Córtex pré-frontal ventromedial

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Neurobiologia do transtorno depressivo maior.....	19
1.2. Neurobiologia do episódio de mania.....	23
1.3. Função tireoidiana, depressão e mania.....	25
1.4. Hormônios tireoidianos.....	26
1.5. Modelos animais de depressão.....	28
1.6. Preferência de sacarose como medida de comportamento tipo-depressivo.....	29
1.7. Modelos de disfunção tireoidiana.....	30
1.8. Dimorfismo sexual.....	31
1.9. Sequenciamento de RNA (RNAseq).....	33
1.10. Justificativa.....	34
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivos gerais.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1. Primeira fase: análise do transcriptoma.....	36
3.1.1. Animais.....	36
3.1.2. Preferência por solução de sacarose.....	36
3.1.3. Estresse crônico brando repetido e imprevisível.....	37
3.1.4. Coleta de tecidos orgânicos.....	38
3.1.5. Preparação das amostras para RNAseq.....	38
3.1.6. Análise estatística e controle de qualidade.....	38
3.2. Segunda fase: avaliação comportamental vs. função tireoidiana.....	39
3.2.1. Animais.....	39
3.2.2. Drogas e tratamentos.....	40
3.2.3. Modelos comportamentais.....	40
I. Preferência por solução de sacarose.....	40
II. Estresse crônico brando repetido e imprevisível.....	40
III. Modelos de indução de hiper/ hipotireoidismo.....	41
IV. Teste do ninho.....	41
V. Análise da escala de pelo.....	42
VI. Teste de natação forçada.....	42
VII. Caixa de locomoção espontânea.....	43
VIII. Teste de esconder esferas.....	43
IX. Teste do labirinto em cruz elevado.....	43
X. Controle de peso corporal.....	44
XI. Quantificação de hormônios tireoidianos.....	44
XII. Análise estatística.....	44
XIII. Delineamento experimental.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Primeira fase: análise do transcriptoma.....	46
4.1.1. Classificação dos animais pelo teste de preferência de sacarose.....	46
4.1.2. Controle de qualidade das amostras.....	47
4.1.3. RNAseq.....	48
I. Controle de qualidade.....	48
II. Alinhamento.....	51
III. Contagem de expressão.....	51
IV. Análise de componente principal (PCA).....	51
V. Expressão diferencial.....	52
VI. “Enrichment pathway analysis”.....	53

a.	Controle versus anedonia.....	53
b.	Controle versus mania.....	55
c.	Refratário versus mania.....	57
d.	Mania versus anedonia.....	59
4.2.	Avaliação comportamental vs. Função tireoidiana.....	62
4.2.1.	1ª bateria – Machos e fêmeas submetidos ao ECBRI.....	62
I.	Preferência de sacarose.....	62
II.	Teste do ninho.....	65
III.	Análise escala de pelo.....	66
IV.	Teste de natação forçada.....	68
V.	Caixa de locomoção espontânea.....	69
VI.	Teste de esconder esferas (marble-burying).....	71
VII.	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	72
VIII.	Análise do peso.....	73
4.2.2.	Modelo de hipertireoidismo em animais submetidos ao ECBRI.....	74
I.	Preferência de sacarose.....	74
II.	Teste do ninho.....	76
III.	Análise escala de pelo.....	76
IV.	Teste de natação forçada.....	78
V.	Caixa de locomoção espontânea.....	79
VI.	Teste de esconder esferas (marble-burying).....	80
VII.	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	80
VIII.	Análise do peso.....	81
4.2.3.	Modelo de hipotireoidismo em animais submetidos ao ECBRI.....	83
I.	Preferência de sacarose.....	83
II.	Teste do ninho.....	85
III.	Análise escala de pelo.....	85
IV.	Teste de natação forçada.....	87
V.	Caixa de locomoção espontânea.....	87
VI.	Teste de esconder esferas (marble-burying).....	89
VII.	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	89
VIII.	Análise do peso.....	90
4.2.4.	Quantificação dos hormônios tireoidianos.....	92
4.2.5.	Classificação dos animais em cada bateria.....	92
5.	DISCUSSÃO.....	94
6.	CONCLUSÃO.....	110
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
8.	ANEXO DO CEUA.....	131

1. Introdução

Os hormônios tireoidianos (HT) são fundamentais em processos do metabolismo, crescimento e diferenciação celular (Brent, 2012). Estes se diferenciam em tiroxina (T4) – secretado em maior quantidade pela glândula tireóide – e triiodotironina (T3), a principal forma biologicamente ativa (Baksi and Pradhan, 2021). No que tange o sistema nervoso central, estes hormônios atuam sobre a neurogênese, migração neuronal, diferenciação neuronal e glial, mielinização e sinaptogênese, em todas as fases da vida (Baksi and Pradhan, 2021). Estudos clínicos demonstram que a deficiência ou excesso de HT manifestam-se como alterações no funcionamento do SNC, incluindo no humor e cognição (Delitala, et al., 2016). Diversos estudos pré-clínicos e clínicos mostram uma relação bidirecional entre distúrbios tireoidianos e transtornos de humor, de modo que tanto o hipertireoidismo e o hipotireoidismo podem levar a comorbidades psiquiátricas, como comportamento tipo-depressivo (Duntas and Maillis, 2013; Hage and Azar, 2012; Kamble et al., 2013), ao passo que estudos reportam que quadros depressivos podem levar a anormalidades tireoidianas (Tsuru et al., 2013; Berent et al., 2014). Adicionalmente, estudos pré-clínicos demonstram relação entre comportamento tipo ansioso e distúrbios nos hormônios tireoidianos (Bauer et al, 2008; Buras, et al. 2014; Heinrich e Graham, 2003). Além disso, um estudo clínico observou que hormônios tireoidianos e especialmente o T3 podem ser usados adjuntos a terapia com antidepressivos, acelerando e potencializando respostas clínicas em pacientes não responsivos (Goodwin et al., 1982). Apesar deste efeito não ter sido replicado, tanto em humanos quanto em animais, outros estudos demonstraram efeito positivo sobre a associação de T3 e antidepressivos em pacientes com depressão não-refratária (Altshuler et al., 2001) e refratária (Chang et al., 2013; Cooper-Kazaz et al., 2006; Lifschytz et al., 2006; Prange et al., 1969). Apesar de se observar maior relação do hipotireoidismo com o transtorno de depressão, tanto pelos sinais clínicos de ambos os transtornos (Hage e Azar, 2012; Duntas e Mailis, 2013), quanto por dados pré-clínicos (Kulikov et al., 1997; Pilhatsch et al., 2010; Olivares et al., 2012), os resultados são heterogêneos, de modo que a relação entre hiper/hipotiroidismo e transtornos de humor não é clara. Estudos demonstram efeitos opostos, p. ex., da Conceição e colaboradores (2016) demonstraram que ratos com hipotireoidismo induzido por tiroidectomia apresentaram menor tempo de imobilidade e escalada no teste de natação forçada, sugerindo um comportamento antidepressivo. Ainda mais, um estudo demonstrou que ratos com hipertireoidismo apresentam comportamentos tipo-depressivos elevados, enquanto que nenhum comportamento tipo-depressivo significativo foi observado em ratos com hipotireoidismo (Redei et al., 2001).

O gênero também é outro fator que parece influenciar na prevalência de ambos os transtornos (tireoidiano e depressivo). Há uma maior prevalência de anormalidades tireoidianas na população feminina (Flynn et al., 2004). Assim como a população feminina é duas vezes mais propensa do que homens ao diagnóstico de transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse, como depressão maior e transtornos de ansiedade (Kendler et al., 1995; Kessler, 2003). No entanto, a maioria dos estudos em modelos não-humanos de depressão usa, em sua maioria, apenas machos (Solomon and Herman, 2009; Dalla et al., 2011; Trainor et al., 2011; Ver Hoeve et al., 2013). Em suma, pode-se inferir que há uma complexa associação entre os hormônios tireoidianos e transtornos de humor, tanto em humanos quanto em animais, e o entendimento da interação entre estes fatores é dificultado pela falta de estudos pré-clínicos em ambos sexos. Devido a estes fatores, faz-se necessário estender estudos acerca do tema.

1.1. Neurobiologia do transtorno depressivo maior:

A depressão é uma doença incapacitante, de grande recorrência e alta prevalência na população, sendo que em 2017 a Organização Mundial da Saúde estimou que ao longo da vida, a prevalência global é de aproximadamente 5% (World Health Organization, 2017). Acredita-se que mais de 50% dos pacientes depressivos terão episódios múltiplos ao longo da vida e de acordo com estudos recentes, os prejuízos sociais e cognitivos de tal doença são devastadores e em certo nível permanentes (Culpepper, 2011). O transtorno depressivo maior ou unipolar (TDM) é caracterizado principalmente por humor deprimido, perda de prazer (anedonia) – sendo estes sintomas centrais da depressão, acompanhados de pelo menos três sintomas adicionais de depressão: alteração do padrão de apetite, insônia, prejuízos na psicomotricidade, fadiga, sentimentos de inutilidade e pensamentos suicidas por um período mínimo de 2 semanas (DSM-V, 2013; Brigitta, 2002). No entanto, as expressões fenotípicas deste transtorno variam entre os pacientes (Hasler, et al. 2004). Além do TDM, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) especifica mais sete variações do transtorno depressivo: depressão bipolar, transtorno de humor induzido por substância, depressão sazonal, transtorno disfórico pré-menstrual, transtorno de humor devido a condição médica geral, perturbação ou desregulação de humor e depressão associada a outras condições. Observando-se a existência de vários tipos de depressão, pode-se inferir que sua neurobiologia é complexa e multifatorial. Também é importante notar que, o TDM tem como etiologia diversos fatores, como genéticos, epigenéticos e ambientais (caracterizado principalmente por resposta anômala ao estresse), que combinados levam ao desenvolvimento do transtorno. Por fim, o distúrbio implica vários mecanismos fisiopatológicos, que podem ser classificados de acordo com a neuroquímica, anormalidades em diversos sistemas (inflamatório, endócrino) e alterações

na circuitaria neural (Dean e Keshavan, 2017). Devido à elevada complexibilidade, diversas teorias que procuram explicar as causas de tal patologia: microbioma intestinal (Foster e Neufeld, 2013), epigenética (Penner-Goeke e Binder, 2019), plasticidade sináptica (Duman et al., 2016), neuroinflamatória (Miller et al., 2009), monoaminérgica, gabaérgica, hiper-responsividade ao estresse e neuroendócrina (Eser et al., 2006; Ménard et al., 2015). De interesse para o presente estudo, as cinco últimas teorias serão abordadas a seguir.

A base da teoria monoaminérgica consiste na redução de monoaminas, inicialmente focada na deficiência da noradrenalina (Shildkraut, et al. 1965) e posteriormente ampliada para outras monoaminas, como a serotonina. A formulação foi originalmente baseada em observações de que a maioria dos antidepressivos agia como inibidores de transportadores da serotonina e da noradrenalina no neurônio pré-sináptico (como por exemplo, a imipramina), portanto, aumentando a neurotransmissão monoaminérgica (Glowinski e Axelrod, 1964; Ross e Renyi, 1969). Estudos com a reserpina, um anti-hipertensivo que depleta a quantidade de monoaminas, principalmente de noradrenalina (pois bloqueia o transporte para as vesículas intracelulares), leva o paciente a um quadro de depressão (Gronli, et al. 2007). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) resultou na regulação negativa dos autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, levando ao aumento de liberação de 5-HT. Tal fato ocorre, pois estes receptores são pré-sinápticos e possuem função inibitória sobre a liberação de 5-HT (Richelson, 2001). Em suma, o envolvimento da noradrenalina (NA) e da 5-HT na patologia da depressão é bem documentado, mas estudos com pacientes depressivos têm relatado uma diminuição de outra monoamina, a dopamina (Rampello et al. 1991; Bonhomme e Esposito, 1998; Anand e Charney, 2000; Hirschfeld, 2000). Além disto, Finan e Smith (2012) observaram que em resposta ao estresse crônico, a desregulação da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica contribui para o desenvolvimento e persistência da depressão (Treadway e Zald, 2011). É interessante citar que a depleção de triptofano, aminoácido essencial para a síntese de 5-HT, em pacientes com remissão dos sintomas após tratamento com antidepressivos induziu recaída, ao passo que em pacientes depressivos sem tratamento ou voluntários normais não se observa tal efeito (Bell, et al. 2001). Tal dado sugere que níveis elevados de monoaminas são necessários para a ocorrência do efeito antidepressivo, mas a diminuição de serotonina não está diretamente ligada à depressão. Ao invés disso, o que ocorre é o aumento da neuroplasticidade nas redes límbicas e corticais disfuncionais, o que permite ao indivíduo adaptação homeostática (Castrén, 2013). Certamente, é bem estabelecido que pacientes depressivos apresentam diminuição da neurogênese hipocampal (Cunha e Frey, 2006). Este efeito está ligado ao

decréscimo do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), característica frequentemente comum em pacientes deprimidos.

O GABA (ácido gama aminobutírico) é outro neurotransmissor que tem sido associado ao desenvolvimento do TDM. Numerosas evidências pontuam que diversos defeitos na transmissão GABAérgica contribuem para a psicopatologia do TDM, sendo a hipótese sustentada em 4 elementos: 1) Pacientes exibem um déficit cortical de GABA, o qual é revertido pelo tratamento crônico com antidepressivos ISRS; 2) Possível deficiência parcial do receptor GABA-A resulta em comportamento tipo-depressivo em animais, sendo tal comportamento revertido por tratamento crônico com antidepressivo; 3) Neurogênese afetada na fase adulta pode ser atenuada através do suporte neurotrófico GABAérgico via subreceptores $\alpha 2$ e $\alpha 3$; 4) Dados clínicos evidenciam atividade antidepressiva sinérgica notável dos ISRS quando associados à eszopiclona, que liga-se especificamente aos receptores GABA-A (Luscher et al. 2011; Luscher e Fuchs, 2015; Hashimoto, et al. 2019). Ainda mais, tal diminuição na transmissão GABAérgica pode ser decorrente do estresse, pois este fator diminui a atividade GABA (Drugan, et al. 1989). Não obstante, estudos pontuam uma relação bidirecional entre este neurotransmissor e a atividade de monoaminas (principalmente da 5-HT). O aumento de GABA pode aumentar ou diminuir a resposta serotoninérgica, sendo tal alteração dependente da região cerebral, ao passo que a 5-HT pode modular a resposta do GABA (Hernández-Vázquez et al., 2019; Dutta et al. 2021; Zhou, et al. 2017). Em relação a estudos clínicos, a quetamina, antagonista dos receptores NMDA, aumenta a transmissão GABAérgica, têm demonstrado atividade antidepressiva rápida e sustentada em doses sub-anestésicas, inclusive para tratamento de depressão resistente (Caddy, et al. 2015; Corriger e Pickering, 2019; Miller, et al. 2014).

A importância da neurogênese na resposta ao tratamento com antidepressivos foi demonstrada em diversos estudos pré-clínicos. Nas últimas duas décadas, pesquisas usando modelos animais de estresse para induzir comportamento tipo-depressivo (como o estresse crônico brando repetido e induzido [ECBRI] e Desamparo Aprendido) estabeleceram que o estresse precipita a depressão principalmente por afetar o hipocampo, resultando em mudanças na neurobiologia de várias regiões cerebrais, como o mesencéfalo e prosencéfalo, em particular o PFC ventromedial (vmPFC). A ação dos antidepressivos consiste na reversão dos efeitos neurotóxicos do estresse no hipocampo, restaurando assim o equilíbrio de atividade normal dentro deste circuito (Willner et al. 2013). No entanto, a neurotoxicidade induzida pelo estresse não é o único problema a ser superado pelos antidepressivos, pois, como citado anteriormente, há outros sistemas em disfunção observados em pacientes depressivos, além dos fatores genéticos e ambientais.

Sabendo que as alterações em neurotransmissores não são os únicos fatores envolvidos na fisiopatologia da depressão, a resposta ao estresse no TDM se tornou muito relevante, uma vez que estes compartilham diversos mediadores, circuitos e fenomenologias (Gold, et al. 2015). O estresse em si pode precipitar a depressão maior, tal como influenciar a severidade, duração e história natural da doença (Gold, 2005; Kendler, et al. 1992; 1995). O estresse pode ser visto como um fenômeno duplo, pois ao mesmo tempo em que esta é uma resposta essencial à sobrevivência do indivíduo, pode causar efeitos adversos ao mesmo, devido a uma instabilidade na secreção de hormônios, alterando a homeostase cerebral (Sapolsky, 1996; Stephen, et al. 2005). Esta resposta adaptativa do organismo, denominada por Selye (1946) como “síndrome geral da adaptação”, responderia a fatores estressores tanto externos quanto internos com uma série de respostas fisiológicas compensatórias orquestradas no intuito de manter a homeostasia, sendo que o principal centro de resposta e adaptação seria então o eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) (Szabo, 1985). A inadaptapção (alostasia) a tais fatores por vez, desencadear o desenvolvimento da depressão. Segundo esta teoria, fatores genéticos precipitariam uma maior responsividade a fatores estressores e a exposição a esses fatores levaria a uma hiper-responsividade ao estresse pela inabilidade do sistema em se auto-inibir (Maier e Watkins, 1998; Henn e Vollmaryr, 2004; Stephen, et al. 2005; Bueno, et al. 2008). Diante de um estímulo estressor, as células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que é o principal coordenador da resposta do eixo HPA, na microcirculação hipofisária. O CRH na hipófise levará a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, ao agir sobre a adrenal, levará a produção de glicocorticoides. Os glicocorticoides, por sua vez, irão modular a atividade do eixo HPA, promovendo um estímulo inibitório à produção de CRH e ACTH através de sua ação no hipocampo e hipotálamo (Juruena, et al. 2004; Aguilera et al. 2007). Além destas áreas, o estímulo estressor estende-se ao sistema límbico, uma vez que este sintetiza neurotransmissores como a serotonina e a noradrenalina, que apresentam um efeito estimulador sobre a liberação de CRH (Owens e Nemeroff, 1993; Nemeroff, 2002). Caso haja falha em tal retroalimentação negativa, o sistema não será então capaz de cessar sua atividade e esse estado de hiperatividade levaria a desensitização dos receptores para CRH. Essa desensitização, por vez, levaria a um aumento dos níveis de cortisol, hipertrofia da adrenal, alterações metabólicas, alteração na função tireoidiana e sexual, desequilíbrio no sistema imune e diminuição de volume do hipocampo (pois a exposição ao estresse leva à diminuição do BDNF) com conseqüente prejuízo cognitivo (Tsigos e Chrousos, 2002; Sainaren et al. 2005; Li et al. 2008). É importante ressaltar que a hipertrofia da adrenal provavelmente explica porque a resposta do cortisol ao CRH é similar em indivíduos deprimidos e em controles. Isto ocorre porque a glândula adrenal aumentada é capaz de

compensar a resposta diminuída de ACTH ao CRH, geralmente observada em pacientes deprimidos (Nemeroff, 1996; Shirayama *et al.* 2002; Saarelainen *et al.* 2003; Sairanen *et al.* 2005; Berton e Nestler 2006; Li *et al.* 2008).

A exposição a longos períodos de estresse, com altos níveis de corticosteroides, podem levar a efeitos pró-inflamatórios. O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode ser explicado por aumento dos níveis de estresse oxidativo. O que ocorreria neste caso seria um sistema de feedback, onde o aumento da atividade do sistema imune, causada pela hiperativação do eixo HPA, levaria a ativação de macrófagos que liberariam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, o que em consequência aumentariam a morte neuronal e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Brooke e McLaughlin, 2002; Kumar *et al.* 2009; Ghadrdoost *et al.* 2011; Patki *et al.*, 2013). De fato, estudos têm associado aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias ao desenvolvimento da depressão ou comportamento doentio (“*sickness behavior*”), sendo as principais citocinas a IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). Estudos reportam que a IL-1 e IL-6 são importantes reguladores centrais da resposta ao estresse, uma vez que estas estimulam a produção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, sendo relacionadas à liberação de glicocorticoides (Palma, *et al.* 2007). Os glicocorticoides por sua vez irão modular a atividade do eixo HPA, promovendo um estímulo inibitório à produção de CRH e ACTH através de sua ação no hipocampo e hipotálamo e pela inibição destas citocinas (Aguilera, *et al.* 2007). Caso haja falha em tal retroalimentação negativa, o sistema não será então capaz de cessar sua atividade e esse estado de hiperatividade levaria a hiporesponsividade dos receptores para CRH. A hiper-reatividade deste eixo levaria à hiporesponsividade do mesmo, pela dessensibilização dos receptores CRH. Estudos em humanos e animais têm demonstrado uma correlação entre os níveis de IL-6 e a depressão (Kubera *et al.* 2004; Monje *et al.* 2011). De acordo com Kubera e colaboradores (2004) quanto maiores os níveis de IL-6, maior o grau de depressão (gravidade dos sintomas). Outra citocina pró-inflamatória relacionada à depressão é o TNF- α (fator de necrose tumoral), sendo que o aumento de TNF- α tem sido associado com o desenvolvimento de quadros de depressão e que, para ambas as citocinas, os pacientes costumam normalizar os níveis após tratamento com antidepressivo (O’Brien *et al.*, 2007).

1.2. Neurobiologia do episódio de mania

Os episódios de mania geralmente estão associados ao transtorno de humor bipolar (THB), em que o humor do paciente varia entre episódios depressivos e episódios maníacos. A fase maníaca caracteriza-se, pela apresentação de alguns dos sinais e

sintomas a seguir: alteração comportamental quanto à psicomotricidade, cognição e nível de energia, por pelo menos uma semana. Nesta fase, o paciente demonstra autoestima elevada, taquilalia (aumento na taxa de articulação ou velocidade de fala, podendo ser intensa o bastante para prejudicar inteligibilidade da mensagem) e falta de atenção. Necessidade de sono reduzida, comportamentos como humor expansivo e eufórico, pensamentos de grandeza (muitas vezes delirantes, podendo resultar no aumento da impulsividade do indivíduo) são frequentemente observados em pacientes maníacos. Nesta fase, é normal que muitas atividades dirigidas a um objetivo sejam iniciadas, além do aumento da sociabilidade e sexualidade (DSM-V; Akiskal *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2005).

Quanto à neurobiologia da fase maníaca, teorias propõem alterações dopaminérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgica, estresse oxidativo e modificações da proteína quinase C (PKC). Também, estudos genéticos correlacionando alterações nos genes CLOCK, alterações no ritmo circadiano e desenvolvimento de comportamento tipo maníaco (Dixon e Hokin, 1998; Bymaster e Felder, 2002; Sabione *et al.* 2008; Yildiz *et al.* 2008; Szabo *et al.* 2009).

No que concerne aos marcadores moleculares, fases maníacas tem sido relacionadas ao aumento dos principais metabólitos de NA e de DA no plasma e no fluido cerebrospinal, assim como taxa de excreção elevada destes metabólitos. E a severidade do episódio maníaco é proporcional à concentração do metabólito de NA no fluido cerebrospinal (Swann, *et al.* 1987). Quanto à DA, tal relação com a mania é demonstrada pela ação de fármacos antipsicóticos, já que esses fármacos são efetivos no tratamento do quadro de mania (Bhana e Perry, 2001; Bymaster e Felder, 2002), ao passo que substâncias que aumentam a atividade dopaminérgica (seja pelo aumento da liberação or agonismo) podem precipitar ou mimetizar (no caso de testes animais) comportamentos maníacos (Sultzer e Cummings, 1989; Peet e Peters, 1995). Em testes pré-clínicos, camundongos nocaute para o transportador de dopamina (DAT) exibem comportamento de risco aumentado quando comparados com camundongos selvagens, o mesmo sendo observado após administração de anfetamina (Zeeb *et al.* 2009). Adicionalmente, estudos relatam a relevância do córtex pré-frontal (CPF) nestas atividades de risco, pois humanos e animais com o CPF lesionado apresentam comportamento de risco elevado; o mesmo é observado tanto em pacientes maníacos quanto em voluntários submetidos a hiperestimulação do sistema dopaminérgico (Clark *et al.* 2001).

O glutamato (Glu), principal neurotransmissor excitatório do SNC, parece ter importância em quadros maníacos, de forma que a excitabilidade neuronal e a rede glutamatérgica parecem estar aumentadas na fase maníaca do THB, além do sistema inibitório desregulado (Öngur et al. 2008; Ng et al. 2009). Estudos reportam que animais submetidos ao tratamento crônico com lítio por 2 semanas obtiveram aumento na captação do glutamato e diminuição da amplitude de variação de sua captação (Dixon e Hokin, 1998). Ainda nesta linha, um trabalho recente mostra que o tratamento crônico por lítio em neurônios primários de camundongos diminui a atividade dos receptores excitatórios, tal como favorece o aumento das sinapses e da densidade de receptores inibitórios; a atividade glutamatérgica seria diminuída pela desaceleração da exocitose das vesículas sinápticas (Khayachi, et al. 2021). O mesmo estudo demonstrou que o tratamento com lítio reduziu a atividade da PKC, podendo ser este o mecanismo primário pelo qual o lítio age para inibir o comportamento maníaco no transtorno bipolar. Embora esta molécula sinalizadora seja importante na regulação de processos pré e pós-sinápticos, este não seria o mecanismo pelo qual a atividade glutamatérgica é diminuída, uma vez que a redução desta proteína está ligada à exocitose mais lenta (Tang, et al. 2019). Ou seja, o mecanismo ainda precisa ser melhor investigado para preencher tais lacunas. Mesmo assim, a hiperatividade da PKC é um fator comumente associado à fase maníaca do THB (Frey et al. 2006; Yildiz et al. 2008). Estudos *post-mortem* revelaram que indivíduos com THB apresentavam atividade elevada da PKC no CPF, e tal hiperatividade foi observada no sangue de pessoas bipolares e em modelos animais de mania, ambos fatos suportando o emprego de inibidores de PKC como tratamento da mania (Hahn e Friedman, 1999; Szabo, et al. 2009; Abrial, et al. 2015).

Quanto ao envolvimento do eixo HPA, pacientes com mania também apresentam níveis aumentados de cortisol no líquido cerebrospinal (Swann, et al. 1994). Tais alterações têm sido correlacionadas com mudanças na fluência verbal, resolução de problemas e desinibição (Lee, et al. 2018). Ainda mais, pacientes maníacos apresentam citocinas pró-inflamatórias elevadas (Daban, et al. 2005; Berk, 2011).

1.3. Função tireoidiana, depressão e mania

Assim como o eixo HPA, o eixo HPT (hipotálamo-pituitária-tireóide) também é responsivo ao estresse, no entanto muito menos estudado (Helmreich, et al. 2005). Este sistema endócrino é responsável por processos importantes como crescimento, diferenciação e metabolismo (Ortiga-Carvalho, et al. 2016). Distúrbios na atividade deste eixo resultam em níveis anormais de hormônios tireoidianos (HT), os quais têm sido

relacionados a transtornos psiquiátricos (Baumgartner, 2000; Joffe, et al. 1996). Importante notar que, devido a sua vasta distribuição no SNC, tais hormônios possivelmente estariam envolvidos ou influenciariam na fisiologia e comportamento (Lazar, 1993; Puymirat, 1992). Notavelmente, estudos pré-clínicos têm demonstrado que mutações que diminuem ou inibem o funcionamento de receptores envolvidos direta ou indiretamente à síntese e atividade de HT levam ao comportamento tipo-depressivo em roedores, além da condição de hipotireoidismo (Zeng, et al. 2007; Pilhatsch, et al. 2010). No que se refere à resposta ao estresse, estudos sugerem que há uma diminuição dos hormônios tireoidianos frente a um estímulo estressor, embora os resultados sejam inconclusivos. Por exemplo, a imobilização pode tanto aumentar quanto diminuir os níveis de hormônios tireoidianos (Langer et al 1983; Turakulov et al. 1994; Marti et al 1996). O estresse por ruído mostrou aumentar os níveis de hormônio tireoestimulante (TSH) (Armario et al. 1984); em contrapartida, a injeção de lipopolissacarídeo (Kondo et al. 1997), bem como o choque inescapável na cauda (Servatius et al. 2000) reduziram os níveis deste hormônios. A diminuição destes hormônios induzida por estresse parece ser mediada, em parte, por mudanças no impulso hipotalâmico para o eixo HPT. Sendo que, tanto os estressores psicológicos (Cizza et al. 1993) quanto metabólicos (Van Haasteren et al. 1995; Fekete et al. 2000) levaram à diminuição nos níveis de mRNA do Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH) dentro do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), resultando em menor produção de HT (Morley, 1981; Scanlon, 1999) e possível quadro de hipotireoidismo.

No que diz respeito ao comportamento tipo-maníaco e disfunções tireoidianas, os dados são ainda mais escassos, e os existentes, heterogêneos. Chang e colaboradores (1998) observaram níveis aumentados de TSH e diminuição dos níveis séricos de T4 na mania mista (episódio misto) versus mania. Estes resultados foram parcialmente corroborados por um estudo no qual pacientes no primeiro episódio agudo de mania mista apresentaram níveis elevados de TSH (Zarate, et al. 1997). Porém, há resultados opostos, no qual diferenças não foram observadas entre ambos os tipos de episódio maníaco (Kirkegaard, et al. 1978; Joffe, et al. 1994; Cassidy, et al. 2002). Portanto, são necessários mais estudos comparando atividade tireoidiana entre indivíduos maníacos e controle, pois não foram encontrados artigos com essa relação.

1.4. Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos são moléculas de tirosina contendo iodeto que consistem em dois tipos: 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3), sendo a glândula tireoide a responsável pela sua síntese e liberação (Ortiga-Carvalho, et al. 2016). Este processo é dependente da atividade do eixo HPT. Neste sistema, o regulador central deste

eixo é o TRH (originário do hipotálamo) que controla a liberação do hormônio tireoestimulante (TSH – presente na glândula pituitária posterior). O TSH, por sua vez, é transportado para a glândula tireoide, estimulando a síntese e liberação dos HT. O T3, devido à sua maior afinidade pelos receptores de HT (RHTs), é a forma biologicamente ativa. O T3 é o responsável por diversos fenômenos biológicos críticos, como provocar o feedback negativo através dos receptores presentes no hipotálamo e na glândula pituitária, inibindo a liberação de TRH e TSH (Morley, 1981; Scanlon, 1999; Ortiga-Carvalho, et al. 2016). Os efeitos do T3 são geralmente mediados por ativação de genes decorrentes da ligação entre T3 e RHTs, pertencentes à superfamília de receptores nucleares que inclui o receptor retinóide X (RXR), o receptor vitamina D (VDR) e o receptor estrogênio (ER) (Ortiga-Carvalho, et al. 2014). Com o fim de exercer efeitos amplos na expressão de genes, o T3 atinge os órgãos-alvo através de diversos transportadores (TBG, TTR, albumina e lipoproteínas). Após penetrar na célula, este hormônio liga-se a receptores nucleares específicos (THRA1, THRB1 e THRB2), modificando a atividade transcricional dos genes-alvo (Robbins, 1996). A presença de diferentes isoformas de RHTs e a distribuição em tecidos específicos permite uma regulação afinada aos diferentes processos durante o desenvolvimento e na vida adulta (Salvatore, et al. 2011).

A transtirretina (TTR) é um dos transportadores de T4, sendo a principal proteína de ligação ao hormônio tireoidiano no cérebro (Schreiber e Richardson, 1997). Embora indivíduos que nascem com deficiência congênita da TBG ou albumina sérica possuam utilização normal dos hormônios tireoidianos, tais transportadores também funcionam como reservatórios de T4 no sangue, influenciando na meia-vida do hormônio no soro humano. Enquanto o T3 possui meia-vida de um dia, a meia-vida do T4 dura de seis a sete dias. A conversão do T4 para sua forma ativa ocorre principalmente no fígado, nos rins, músculos e no cérebro. Tal processo é executado pelas enzimas deiodinases, que variam em subtipo de acordo com o tecido em que seu metabolismo ocorre (Braverman, et al. 1970; Bianco, 2011). A deiodinase-1 (Dio1) converte o T4 em T3 nos tecidos periféricos, enquanto que a deiodinase-2 (Dio2), presente em grande parte nas células gliais, ativa tal hormônio no SNC. A deiodinase-3 (Dio3) inativa o T3, sendo amplamente presente no cérebro adulto (Hernandez, et al. 2010). Estas deiodinases constituem uma vantagem homeostática, devido a sua resposta recíproca ao hipotireoidismo (Bianco et al., 2002; Silva e Larsen, 1986): enquanto a Dio2 acelera a atividade dos hormônios, aumentando a conversão fracional de T4 para T3, a Dio3 inativa T3 e T4 (Peeters et al., 2001). Levando tais fatos em conta, estudos prévios reportam que a deiodinação no cérebro pode ter um papel importante em transtornos de humor. Por exemplo, a administração de antidepressivos aumenta a atividade da Dio2 em cérebros de roedores (Campos et al., 1994; Baumgartner et al., 1994). Paralelamente, um camundongo resistente à depressão induzida por estresse apresenta um

aumento na expressão hipocampal da Dio2 e Dio3 (Markova et al., 2013). Sendo assim, devido à capacidade do cérebro de autorregular a conversão de T3 a partir de T4, os índices tireoidianos periféricos nem sempre refletem a atividade tireoidiana central (Hendrick et al, 1998).

1.5. Modelos animais de depressão

Os modelos animais são recursos indispensáveis na avaliação da circuitaria neural e as vias moleculares e celulares da disfunção/transtorno investigada, bem como na investigação de novas substâncias terapêuticas potencialmente mais efetivas. Além disto, a possibilidade de manipulação com agentes farmacológicos e edição de gene em ambiente controlado auxilia na elucidação de novas descobertas (Nestler and Hyman, 2010). Em todo modelo animal há restrições, e no caso dos modelos de depressão, a principal limitação seria a incapacidade de mimetizar características mais psicológicas, como sentimento de culpa, ideação suicida e humor depressivo. Em razão disto, há critérios que sempre devem ser lembrados quando se trata de modelos animais de depressão, possibilitando a criação de um paralelo entre o comportamento do animal (embora carente de todos os sintomas) e a patologia em si. Dentre estes critérios, podemos citar a validade de face (fenótipo similar à doença em humanos), validade preditiva (sensibilidade a intervenções farmacológicas e não-farmacológicas que são eficazes na clínica) e validade de constructo (o modelo produz os mecanismos neurobiológicos da doença) (McKinney and Bunney, 1969). Os testes mais antigos para estudo de comportamento tipo-depressivo normalmente apresentam validade preditiva, como é o caso do teste de natação forçada e teste suspensão pela cauda. Ambos os testes consistem em submeter o animal a uma situação inescapável, e o tempo de imobilidade (parâmetro para comportamento tipo-depressivo) é reduzido por antidepressivos eficazes na clínica (Cryan *et al.* 2002; Skalsiz *et al.* 2004; Raupp *et al.* 2008)

Baseado na etiologia da depressão, os modelos animais foram desenvolvidos baseados na exposição a fatores estressores, interação gene-ambiente, administração exógena de glicocorticoides e manipulação genética (Caspi and Moffitt, 2006; McGonagle and Kessler, 1990; Surís et al., 2010; Uher and McGuffin, 2010). A exposição de roedores a fatores estressores de uma maneira continuada mimetiza muitos dos aspectos observados em pacientes depressivos, tais como: (a) aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides (Kubera *et al.* 2001; Joels *et al.* 2004) com consequente hipertrofia da adrenal (Reul *et al.* 1993); (b) alterações de sono REM (Moreau *et al.* 1995); (c) o aumento da nNOS (Yazir, *et al.* 2012); (d) diminuição da neurogênese hipocampal (Joels *et al.* 2004). Desta maneira, o modelo de ECBRI é amplamente utilizado para o estudo da depressão (Willner *et al.* 1997). Portanto, o ECBRI apresenta uma boa validade de constructo e, por induzir um

comportamento anedônico nos animais (que consiste na diminuição de um efeito reforçador positivo, neste caso, perda pela preferência por solução de sacarose) e pela reversão deste comportamento ser possível com os mesmos tratamentos utilizados em humanos, pode-se considerar que tal modelo possui também validade de face e preditiva (Mattson, *et al.* 2004; Tsigos e Chrousos, 2002; Gronli, *et al.* 2006; McArthur e Borsini, 2006; Casarotto e Andreatini, 2007). Um fato que reforça sua validade preditiva é que apenas o tratamento crônico com antidepressivos reverte as disfunções induzidas pelo ECBRI, e o mesmo é observado na clínica. O modelo do ECBRI baseia-se em induzir anedonia (um dos comportamentos centrais da depressão) no animal submetendo-o a uma variedade de situações estressoras brandas diariamente (por no mínimo 4 semanas), e tal comportamento é mensurado pelo teste de preferência de sacarose (McArthur e Borsini, 2006).

1.6. Preferência de sacarose como medida de comportamento tipo-depressivo

O consumo de sacarose em roedores é a medida de comportamento tipo-depressivo mais utilizada no modelo do ECBRI (Matthews, *et al.* 1995; Bekris, *et al.* 2005; Wallace, *et al.* 2009). Este teste é validado com base na supressão do comportamento hedônico em resposta ao estresse.

A ligação entre a preferência por soluções doces e o estado hedônico foi baseada na evidência de que a informação visceral positiva e negativa possui alto impacto nos processos cognitivos e comportamentais (Berntson, *et al.* 2003). Baseado no trabalho de Willner *et al.* (1987), no qual camundongos submetidos ao estresse apresentaram uma diminuição de cerca de 15% na preferência de sacarose, sendo o consumo basal médio destes animais 80% antes do protocolo de estresse.

No entanto, a exposição ao estresse nem sempre resulta em desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo, pois este efeito, como citado anteriormente, é influenciado por diversos fatores genéticos, moleculares e ambientais. Sendo assim, têm-se observado que uma parcela dos animais submetidos a protocolos de estresse (estes idênticos e controlados a todos os animais) são resilientes ao estresse, não desenvolvendo comportamento tipo-depressivo (Higushi *et al.*, 2016). Ainda mais, o comportamento anedônico pode ser induzido pela desregulação do sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico em situações de estresse crônico ou depressão, uma vez que o mesmo sistema participa na elevação da disposição e humor do indivíduo frente a estímulos estressores agudos (Gold e Chrousos, 2002).

Na realidade, uma relação recíproca entre o consumo de sacarose e a atividade dopaminérgica tem sido postulado. Tal fato foi demonstrado por estudos que reportam aumento na liberação de DA no núcleo accumbens (NAcc) quando a sacarose é consumida, ao passo a elevação da atividade dopaminérgica (por meio de drogas que bloqueiam sua recaptação) resulta no aumento do consumo de sacarose. Em contraparte, a administração de um antagonista de DA diminui o consumo de sacarose (Hajnal e Norgren, 2001; Smith e Smith, 2010). Ainda mais, a liberação da DA no NAcc parece ser uma função linear da concentração da solução de sacarose que o animal consome (Hajnal, et al. 2004; Liang, et al. 2006). Em suma, a atividade dopaminérgica no NAcc regula o consumo de sacarose, possivelmente exercendo um papel fundamental no circuito de recompensa obtido da sacarose (Hajnal e Norgren, 2004).

Flaisher-Grinberg e colaboradores (2009) sugere que o consumo de sacarose elevado poderia ser um indicativo de comportamento tipo-maníaco. Sendo assim, o aumento em mais de 15% no consumo de sacarose poderia ser interpretado como um comportamento tipo-maníaco. Dois fatos embasam essa teoria: o comportamento hedônico é elevado em pacientes maníacos, e o tratamento com estabilizadores de humor reduz o consumo de sacarose (Flaisher-Grinberg, et al. 2009; Fallah, et al. 2016). Em síntese, seria mais interessante classificar os animais de acordo com seu consumo de sacarose individual, pois assim como na população geral, a resposta ao estresse pode desencadear comportamento tipo-depressivo ou tipo-maníaco, além de termos indivíduos resilientes ao estresse.

1.7. Modelos de disfunção tireoidiana

Os modelos de disfunção tireoidiana consistem em induzir hipertireoidismo (altos níveis plasmáticos de T3/ T4 livre) ou hipotireoidismo (baixas concentrações de T3/ T4 livre no plasma). Atualmente a condição de hipotireoidismo pode ser induzida por modelos animais genéticos, cirúrgico e farmacológico. Alguns modelos genéticos desenvolvidos recentemente consistem na inativação de receptores envolvidos na atividade do T3. Além de abordagens mais pontuais no mecanismo de transtornos tireoidianos, alguns estudos estabeleceram conexão com o comportamento tipo-depressivo em camundongos. Por exemplo, animais nocaute (KO) para o receptor tipo 1 do Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH-R1) exibiram comportamento tipo-depressivo elevado e hipotireoidismo, ao passo que camundongos KO para o receptor tipo 2 do TRH apresentaram comportamento tipo-depressivo, mas permaneceram eutireóides (níveis normais de T3, T4 e TSH) (Zeng, et al. 2007; Sun, et al. 2009). Outro modelo genético demonstrou que camundongos mutantes para o receptor $\alpha 1$ do HT, por ter afinidade diminuída ao T3, apresentaram hipotireoidismo e comportamento tipo-depressivo (Pilhatsch, et al. 2010). No entanto, modelos cirúrgicos e

farmacológicos são tipicamente mais utilizados, por serem mais acessíveis e de fácil aplicação (Streetman e Khanderia, 2003). Os modelos cirúrgicos, que consistem na tireoidectomia (remoção da tireóide), são mais invasivos e os podem causar danos às glândulas paratireoides, o qual pode resultar em queda nos níveis séricos de cálcio – este proposto possuir um papel causal na depressão (Rizvi, et al. 2012). Por sua vez, os modelos farmacológicos são de fácil aplicação e pouco invasivos, pois os fármacos são administrados na água do animal ou por injeção via intraperitoneal (ip). Os fármacos utilizados possuem atividade anti-tireoidiana, dentre eles o metimazol (MMI) e o propiltiouracil (PTU). Estas têm sido empregadas no tratamento da doença de Graves há mais de 50 anos (Cooper, 1998). Estes fármacos bloqueiam a síntese de T3 e T4 nas células foliculares (Taurog e Dorris, 1989), sendo que o PTU apresenta um mecanismo adicional que consiste na inibição da Dio1, levando à redução da conversão de T3 para T4 (Cooper, 1998). Por estas razões, elas induzem o estado de hipotireoidismo em algumas semanas, tal que o tempo de indução é dependente da dose e do protocolo aplicado.

No caso de modelos de hipertireoidismo, estes consistem em modelos genéticos e farmacológicos. Os modelos genéticos de hipertireoidismo que avaliaram comportamento tipo-depressivo consistem em mutações que levam à deficiência na Dio3 (Stohn, et al, 2016; 2019). No entanto, a elevação de HT foi somente no cérebro, de maneira que periféricamente, foi observado um estado hipotireóide. Quanto aos modelos de indução farmacológicos, estes consistem basicamente em administração crônica, via i.p., de fármacos utilizados no tratamento do hipotireoidismo, como L-tiroxina ou T4 (Yu, et al. 2015). As alterações nos níveis de HTs são comumente mensuradas no soro ou plasma por ELISA, para confirmar a eficácia do modelo empregado.

1.8. Dimorfismo sexual

Diversas evidências clínicas e experimentais documentam diferenças sexuais na anatomia cerebral, química e funcional (Pitychoutis e Papadopoulou-Daifoti, 2010; Dalla, et al. 2010). Consequentemente, o gênero é outro fator que parece influenciar na prevalência dos transtornos tireoidianos e de depressão. Estudos reportam que as mulheres têm maior risco de desenvolver patologia associada ao estresse, sendo que a razão do risco é 2:1 (mulheres/ homens) (Kessler, 2003; Gardner e Kendler, 2014). Estas diferenças vão além da taxa de prevalência e também são visíveis na manifestação de sintomas, início, curso da doença e eficácia do tratamento (Loo, et al. 2018). Assim sendo, tem sido sugerido que mulheres podem responder de maneira diferente ao estresse, usando estratégias distintas dos homens em face deste evento (Maciejewski et al., 2001; Klein e Corwin, 2002; Nemeroff et al., 2006). Embora modelos de depressão em roedores tenham contribuído enormemente

para desvendar os mecanismos neurais subjacentes às respostas comportamentais ao estresse, tais modelos usam, em sua maioria, apenas machos (Solomon and Herman, 2009; Dalla et al., 2011; Trainor et al., 2011; Ver Hove et al., 2013). Apesar desta limitação, pode-se encontrar alguns dados que demonstram diferenças, como um estudo que demonstrou uma resposta hedônica à sacarose enfraquecida em ambos os sexos, mas este fenômeno parece ser mais consistente em machos quando comparado às fêmeas (Dalla, et al. 2008; Kamper, et al. 2009). Tem sido sugerido que o consumo de sacarose pode não servir como um parâmetro comportamental apropriado para ratas, pois estas possuem tendência a ingerir maiores quantidades de solução de sacarose do que ratos. No entanto, outros estudos demonstraram que ratas apresentaram uma resposta anedônica mais robusta após exposição ao modelo do estresse crônico (Konkle et al. 2003; Xing et al. 2013). Interessante citar que diferenças sexuais nas preferências de sabor podem ser impactados pelos hormônios ovarianos para fêmeas, tal que para o tipo “doce” em ratos parece ser parcialmente dependente do estradiol (Zucker, 1969; Clarke and Ossenkopp, 1998). Sendo assim, a resposta à solução de sacarose pode ser mais instável em fêmeas devido à interrupção do ciclo estral que frequentemente acompanha a exposição ao estresse crônico brando (Dalla, et al. 2005). Estes fatos indicam que o meio hormonal influenciado pelo sexo pode afetar diferencialmente as alterações comportamentais observadas e roedores experimentais.

Assim, o aspecto hormonal parece ser relevante nas diferenças sexuais observadas em vários aspectos fisiológicos. Alguns estudos relatam que há maior incidência de anormalidades tireoidianas na população feminina (Flynn et al., 2004), fato que pode ser devido a diferença nos níveis séricos de TSH entre gêneros, tal que este pode prever sintomas depressivos em mulheres (mesmo quando a disfunção tireoidiana é sutil), sendo então um fator de risco (Forman-Hoffman and Philibert, 2006; Kim, et al., 2015). Neste estudo clínico, observou-se que a incidência de depressão é associada com a elevação dos níveis séricos de TSH em mulheres com taxas normais de T4 livre. Ainda mais, a reserva hormonal tireoidiana pode ser mobilizada de maneira mais eficaz em homens, quando há quadro depressivo (Abulseoud et al., 2007). Na realidade, o dimorfismo sexual da função tireoidiana parece existir desde o início do desenvolvimento. A diferença sexual nos níveis de hormônios tireoidianos do cérebro durante o desenvolvimento pós-eclosão em peixe-zebra foi notada, enquanto o início do aumento de T4 nos machos precedeu o das fêmeas, bem como o início do T3 mais alto nas fêmeas começou antes do que nos machos (Yamaguchi et al. 2017; Niyama et al. 2020). Além disso, outro estudo com ratas ovariectomizadas demonstrou uma correlação positiva entre os níveis de mRNA de progesterona e Dio2, uma vez que a falta de progesterona levou à redução da expressão de

Dio2 em vários tecidos (incluindo o cérebro), resultando na supressão da conversão periférica de T4 em T3 (Awad e Alrefaie, 2014). O estrogênio também é relevante, pois este é responsável pelo aumento da capacidade de ligação na globulina de ligação à tiroxina (Engbring e Engström, 1958; Franklyn, et al. 1985).

Diferenças sexuais também foram encontradas no comportamento e morfologia neuronal em um modelo animal de hipertireoidismo farmacológico. Niyama e colaboradores (2020) descobriram que camundongos fêmeas com hipertireoidismo exibiam uma morfologia diminuída dos espinhos dendríticos das células granulares no giro denteado, resultando na formação de espinhos de tamanho pequeno, modificando a sinapse celular de forma diferencial entre os sexos. Tal mudança pode estar relacionada a diferentes comportamentos entre os sexos, pois apenas as fêmeas apresentaram comportamento tipo depressivo. De fato, dados anteriores relataram que o tratamento antidepressivo induz aumento nas espinhas dendríticas das células granulares do hipocampo, indicando que tal diminuição no tamanho da espinha pode estar associada a um comportamento semelhante à depressão. Além disso, foram relatadas alterações sexo-dependentes na morfologia glial do cérebro em estado de hipertireoidismo, de modo que camundongos machos jovens apresentaram aumento do corpo celular da micróglia e astrócitos no córtex cerebral e hipocampo, enquanto as fêmeas não apresentaram alterações (Noda et al. 2016). O astrócito é o principal efetor do metabolismo de TH no cérebro, que controla a produção local de T3 através da deiodinação de T4. Tais resultados sugerem que os astrócitos cerebrais podem ter sido estimulados pela elevação de T4 circulante e transportado e, portanto, contribuem para uma maior produção local de T3 no cérebro, levando a uma ativação da micróglia (Noda et al. 2016). No entanto, a razão de não haver alterações na ativação glial do cérebro feminino pode ser devido à sua atividade microglial basal, uma vez que foram relatadas diferenças transcricionais e translacionais na micróglia no cérebro masculino e feminino – a micróglia masculina é morfologicamente mais alta e mais abundante em algumas áreas do cérebro (Guneykaya et al. 2018). Aparentemente, os hormônios sexuais podem contribuir para discrepâncias sexuais na neurotransmissão, conectividade funcional e estrutura cerebral (Barth et al. 2015). Tal dimorfismo está presente em níveis morfológico, molecular e comportamental, sendo necessário elucidar esses mecanismos em condições de fenótipo tipo depressão e disfunção tireoidiana (Niyama et al. 2020).

1.9. Sequenciamento de RNA (RNAseq)

Os transtornos mencionados acima são multifatoriais e variáveis entre os indivíduos, refletindo nas diferenças observadas nos sintomas apresentados e na resposta aos

tratamentos, quando há resposta. Nesta linha, o mapeamento do transcriptoma é uma ferramenta importante para lidar tal problema (Ozsolak e Milos, 2011). O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula, e sua quantidade é dependente do estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica. A compreensão do transcriptoma é essencial na interpretação dos elementos funcionais do genoma e na revelação dos constituintes moleculares das células e tecidos. Todos esses fatores contribuem no conhecimento acerca do desenvolvimento de diversas doenças. Durante o sequenciamento de RNA (RNAseq) são sequenciadas todas as espécies de transcritos, incluindo RNAs mensageiros (mRNAs), RNAs não-codificantes e RNAs pequenos (sRNAs - que incluem microRNAs), RNAs associados a promotores e RNA associado ao terminal 3' *antisense*, dentre outros (Birney, et al. 2007; Berretta e Morillon, 2009; Kapranov, et al. 2007). Ainda mais, pode-se estabelecer os padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais, além de quantificar a mudança dos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (Wang, et al. 2009).

O RNAseq utiliza tecnologias de alto sequenciamento desenvolvidas recentemente. Na prática, uma população de RNA (total ou fracionada) é convertida a uma biblioteca de fragmentos de DNA codificante (cDNA) com adaptadores anexados a uma ou ambas extremidades. Cada molécula é sequenciada em alto rendimento, resultando em sequências curtas de uma extremidade (sequenciamento de extremidade única) ou ambas as extremidades (sequenciamento de extremidade dupla). Normalmente, as leituras são de 30-75 pb (pares de bases), dependendo do método de sequenciamento de RNA aplicado. Mais ainda, tal técnica apresenta resolução suficiente para a detecção de alterações de base única (presença de SNP) (Cloonan, et al. 2008; Marioni, et al. 2008; Morin, et al. 2008; Barbazuk, et al. 2007). Em síntese, o uso de técnicas de screening para alterações moleculares podem ser de maior valor que a busca por um único alvo, uma vez que possibilitam a análise global de alterações e abre portas para novas teorias de mecanismos.

1.10. Justificativa:

Embora existam diversos estudos acerca da relação bidirecional entre função tireoidiana e alterações de humor, os resultados não são unânimes. Além disto, o mecanismo pelo qual os hormônios tireoidianos afetam o humor e vice-versa ocorre, ainda precisa ser elucidado mais detalhadamente em ambos os sexos, tal que a incidência de transtornos tireoidianos e de depressão são diferentes entre a população masculina e feminina. Assim sendo, o modelo do ECBRI é viável para seu estudo, pois a exposição de camundongos a diferentes tipos de estresse resultou em alterações nos níveis de HT.

Sendo assim, é interessante avaliar tais alterações hormonais em um modelo que possui boa validade preditiva, de face e de constructo.

2. Objetivos

O presente trabalho apresenta dois objetivos principais: analisar as possíveis alterações nos níveis de RNA em decorrência do estresse crônico, através do método de RNAseq, e avaliar a relação entre disfunções tireoidianas e alterações comportamentais (tipo maníacas e depressivas) decorrentes do estresse crônico.

2.1. Objetivos gerais

- Avaliação da variação na transcriptômica em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de ECBRI.
- Avaliação das diferentes respostas comportamentais em camundongos Swiss machos e fêmeas, submetidos ao modelo do ECBRI concomitantemente ao modelo experimental de disfunção tireoidiana.
- Avaliação das alterações nos níveis de hormônios tireoidianos nestes animais.

2.2. Objetivos específicos

Primeira fase: análise do transcriptoma

- Avaliar as possíveis alterações nos níveis de RNA (através do RNAseq) no CPF de camundongos C57BL/6 machos submetidos ao modelo de ECBRI.
- Classificação dos animais de acordo com o fenótipo apresentado no teste de preferência de sacarose (controle, refratário, anedônico e maníaco), e comparação de tais fenótipos com a diferença na expressão de RNA.
- Análise da relação entre a expressão diferencial de RNA e a classificação do camundongo segundo a preferência de sacarose.
- Análise das vias e genes diferencialmente expressos nestes grupos.

Segunda fase: Avaliação comportamental X Função tireoidiana

- Avaliar o efeito do ECBRI sobre a função tireoidiana em camundongos Swiss machos e fêmeas.
- Avaliar se o ECBRI é capaz de alterar o comportamento dos camundongos machos e fêmeas, esperando-se que um comportamento tipo depressivo, ansioso ou maníaco seja detectado, através dos modelos seguintes:

- Modelos de ansiedade: Labirinto em Cruz Elevado e Teste de Esconder Esferas (Marble-burying test).
- Modelos de Depressão: Teste de Preferência por Solução de Sacarose, Teste do Ninho e Teste da escala de pelo.
- Modelos de Atividade Motora: Caixa de movimentação espontânea.
- Avaliar a influência do hipo- e hipertireoidismo experimental na resposta comportamental ao ECBRI em camundongos machos e fêmeas.
 - Avaliar a influência do hipertireoidismo experimental induzido por administração repetida de T4 na resposta comportamental ao ECBRI.
 - Avaliar a influência do hipotireoidismo experimental induzido por MMI na resposta comportamental ao ECBRI.
- Avaliar se a associação entre o modelo de estresse e o hipo/ hipertireoidismo pode piorar o comportamento tipo-depressivo ou tipo-maníaco observado nos animais.
- Detectar as possíveis diferenças comportamentais e séricas de HT entre machos e fêmeas.

3. Material e métodos

3.1. Primeira fase: análise do transcriptoma

3.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (n=50), pesando entre 20-30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram aclimatados por pelo menos duas semanas nas salas de manutenção do laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Sistema Nervoso Central do Departamento de Farmacologia da UFPR, mantidos isolados. Os animais eram mantidos em caixas de polipropileno (30 x 20 x 13 cm) em condições controladas de temperatura (21 ± 1 o C), com ciclo claro-escuro de 12 h.

3.1.2. Preferência por solução de sacarose

A preferência de sacarose foi empregada inicialmente para mensurar a indução do comportamento anedônico nos camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico. Primeiramente, a preferência basal de sacarose dos animais foi calculada, através da exposição destes a três testes de preferência à sacarose. A partir da média da preferência

dos três testes, foi feito o pareamento dos animais em duplas, a partir da similaridade da preferência. Em seguida, cada dupla de camundongos foram divididos entre grupo controle e grupo estresse de maneira randomizada (randomização estratificada). Posteriormente, os animais foram expostos a baterias de estresse brando repetido (detalhado em seguida) e a alteração na preferência de sacarose foi quantificada e posteriormente aplicada na classificação dos animais quanto ao comportamento apresentado. As baterias e o teste de preferência de sacarose eram aplicados por 5 semanas consecutivas, tempo estabelecido para que os camundongos do grupo estresse adquiram alterações comportamentais, como anedonia (redução da preferência por solução de sacarose). A preferência de sacarose é medida individualmente (cada camundongos isolado em uma caixa) através da pesagem das garrafas de água e de sacarose antes do teste e após 24 horas, usando-se a diferença para o cálculo da preferência de sacarose, que é feita através da equação abaixo:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{consumo total de sacarose} \times 100}{\text{Consumo total (H}_2\text{O} + \text{sacarose)}}$$

A análise da preferência de sacarose foi feita com base no protocolo modificado a partir do teste proposto por Monleon e colaboradores (1995). A partir da curva de preferência dos animais estabelecida em nosso laboratório, a concentração na solução de sacarose foi de 1%. Esta, por ser a menor dose que apresentou diferença em relação à água, possui menor efeito reforçador, possibilitando a observação de alterações comportamentais induzidas por estresse brando.

3.1.3. Estresse crônico brando repetido e imprevisível

Os camundongos foram divididos em dois grupos, estressados e não estressados, randomicamente divididos com base no consumo basal de sacarose apresentado pelos animais.

As baterias de estresse foram iniciadas em horários diferentes do dia, para evitar que o animal se habitue a um horário específico de manipulação e com isso não desenvolvam o comportamento anedônico. Eles foram expostos diariamente a diferentes tipos de estresse, sendo que cada semana a bateria era randomizada para evitar habituação a seqüência de estressores (Monleon et al., 1995; Willner, 2005).

Os estresses a que os animais foram submetidos eram:

- Caixa inclinada;
- Exposição a claro constante (24h);
- Exposição a escuro constante (24h);

- Privação de água (máximo de 18h);
- Privação de comida (máximo de 18h);
- Cepilho úmido (24h).

A cada semana os animais foram submetidos ao teste de preferência de sacarose e após cinco semanas, com o comportamento anedônico estabelecido, os animais foram eutanasiados e amostras de tecido foram recolhidas.

3.1.4. Coleta de tecidos orgânicos

Após o término do modelo de ECBRI, os animais foram rapidamente decapitados e seu cérebro congelado imediatamente em isopentano e gelo seco. As amostras foram alocadas em freezer -80 °C até o envio das mesmas ao Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia) para análise dos diferentes tipos de RNA no CPF.

3.1.5. Preparação das amostras para RNAseq

Microdissecação do CPF (aproximadamente 10mg de tecido) foi executada em câmara fria, seguida de estabilização usando a solução de RNAlater (AM7021). As amostras foram então transferidas para o freezer (-20C) para posterior processamento.

No dia seguinte as amostras foram homogeneizadas em solução para extração do RNA e o protocolo fornecido no kit de extração, executado (Quiagen, CAT: 74104). O protocolo consiste na homogeneização e múltiplas lavagens e centrifugação das amostras. Para a execução de tal protocolo, foi necessário especial cuidado para evitar degradação do RNA, sendo que após extração, alíquotas da amostra são processadas para leitura das concentrações de RNA e para RNAseq.

Amostras destinadas à leitura da concentração de RNA são então lidas no Bioanalyser - Agilent usando o chip RNA nano (CAT: 5067-1511). Baseado nas concentrações de RNA, as amostras foram diluídas e entregues para sequenciamento.

O sequenciamento das amostras foi realizado no SciLife Stockholm – Suécia. Para tal sequenciamento, a biblioteca foi criada usando Illumina TruSeq Stranded mRNA, PolyA selection e sequenciado usando Illumina HiSeq 2500 Rapid Mode SR 1x50bp com 6 linhas (total de 3 células de fluxo) e >15M de leitura.

3.1.6. Análise estatística e controle de qualidade

Após o ultimo teste de preferência de sacarose, o valor de aumento ou diminuição no consumo em comparação ao valor basal foi medido. A diminuição de pelo menos 15% e/ ou preferência abaixo de 65% da solução de sacarose foi definida como comportamento

anedônico. A não alteração da preferência foi classificada como comportamento refratário, enquanto que a preferência inicial ou final acima de 85% e/ ou aumento da preferência em 10% foi considerado comportamento tipo maníaco.

O próximo passo foi extração do RNA e análise da concentração e qualidade do RNA obtido, este foi diluído para que todas as amostras fossem igualadas em termo de concentração.

Para a análise do RNAseq, várias sequências de análise são necessárias. A análise executada neste trabalho é baseado no protocolo publicado pelo SciLife no seu GitHub (<https://github.com/SciLifeLab/NGI-RNAseq>).

Primeiramente, todas as amostras são submetidas a um teste de qualidade usando MultiQC, amostras com baixo valor de fidelidade são excluídas da análise ou tem a porção de baixa qualidade eliminada, usando Trimomatic. Após tal análise, as amostras são alinhadas usando STAR (protocolo básico para “single read” alinhada com o genoma de camundongo (GRCm38)). Após alinhamento as amostras são novamente testadas para qualidade usando MultiQC.

Com as amostras selecionadas, o passo seguinte é a contagem de leituras para cada gene, tal leitura é feita usando HISAT2. Após a contagem das leituras, um arquivo de dados de fenótipo é feito e análise de expressão diferencial é calculada.

Para a leitura de expressão diferenciada foi usado EdgeR. Todos os valores de p foram ajustados usando o método de Yosef Hochberg (BH) para a eliminação de “false discovery rate” típica de múltiplas análises como RNAseq.

Uma lista de genes com expressão diferenciada e significativa foi feita comparando duas distintas condições: Controle x Anedonia; Controle x Refratário; Controle x Mania; Refratário x Anedonia; Refratário x Mania e Mania x Anedonia. Com estas listas, “enrichment analysis” foi feita usando Gsea software usando “C5 collection: Gene Ontology (GO) gene sets”.

Para a maioria das análises foi utilizado o Chipster, uma interface para facilitar a utilização de programas que normalmente rodam em promp. MobaXterm foi utilizado para ter acesso ao megacomputador do Sistema SNIC, única forma de processar dados tão pesados quanto a análise do RNAseq. E finalmente, R software foi usado para “PCA analysis”, “heatmaps” e análise de correlação.

3.2. Segunda fase: Avaliação comportamental vs. Função tireoidiana

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (n=180) e fêmeas (n=180), pesando entre 25-35g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos isolados ou em grupos de até 5 animais por caixa. Os animais eram mantidos em caixas de

polipropileno (41 x 34 x 16 cm) em condições controladas de temperatura (21 ± 1 o C), com ciclo claro-escuro de 12 h. Cada sexo foi mantido em salas separadas, tal como os experimentos executados por sexo, para evitar estresse adicional.

3.2.2. Drogas e tratamentos

- Metimazol - 0,02% (Sigma-Aldrich (301507), EUA): empregada para indução de hipotireoidismo, dissolvida em água potável, administrada no bebedouro dos animais por 3 semanas antes do início do modelo de ECBRI, sendo o tratamento mantido durante as 5 semanas de estresse (Rakov, et al. 2016).

- Perclorato de sódio – 0,5% (ClO₄⁻; Sigma-Aldrich (310514), EUA): empregada em conjunto com o MMI, dissolvida em água potável, administrada no bebedouro dos animais para indução do hipotireoidismo (Rakov, et al. 2016).

- L-tiroxina - 1 µg/g (Sigma-Aldrich (T2376), EUA): empregada no modelo de indução do hipertireoidismo, dissolvida em 0,01 M NaOH e 0,1% BSA (albumin from bovine serum) para ser armazenada em geladeira como solução estoque. No dia do tratamento, uma proporção da solução estoque era diluída em PBS (1/10) e administrada via i.p., a cada 48h, por 8 semanas, com início 3 semanas antes do modelo de ECBRI (Rakov, et al. 2016).

As doses propostas foram baseadas no estudo de Rakov et al. (2016). Todas as drogas foram administradas em volume constante de 10 ml/kg de peso corporal.

3.2.3. Modelos comportamentais

I. Preferência por solução de sacarose

O modelo foi aplicado igualmente à primeira fase, citada acima. A análise do consumo nos animais foi utilizada como base para a classificação dos animais de acordo com seu consumo individual, sendo estes então divididos em controles (não estressados), anedônicos, maníacos ou refratários.

II. Estresse crônico brando repetido e imprevisível

Este modelo experimental foi aplicado de maneira praticamente igual à primeira fase, com uma diferença, referente ao início do estresse crônico. Neste caso, as exposições basais à preferência de sacarose (para divisão do grupo estresse X controle) e ao modelo de ECBRI se iniciaram após as três semanas de tratamento previstas para indução da disfunção tireoidiana (descrito no item 3.4.3), mas a duração do protocolo de estresse foi mantida (5 semanas).

Após a 5ª semana de estresse, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, como caixa de locomoção (detalhado no tópico 3.4.7), teste de natação forçada (detalhado no tópico 3.4.6), teste de esconder esferas (detalhado no tópico 3.4.8) e teste do labirinto em cruz elevado (detalhado no tópico 3.4.9). Além destes ensaios, os animais foram analisados semanalmente quanto à escala de pelo (detalhado no tópico 3.4.5), teste do ninho (detalhado no tópico 3.4.4) e preferência de sacarose.

III. Modelos de indução de hiper/ hipotireoidismo

O modelo utilizado foi proposto por Rakov e colaboradores (2016). Para a indução do hipertireoidismo, injeções via i.p. de 1 µg/g de T4 (Sigma-Aldrich (T2376), EUA) foram administradas nos animais a cada 48 h, sendo que o grupo controle recebeu, pela mesma via, injeções de PBS.

O modelo de indução de hipotireoidismo consistiu em submeter os animais a uma dieta pobre em iodo, sendo estes alimentados com ração específica encomendada, produzida pela Nuvilab. A composição da ração foi baseada na ração utilizada no estudo citado (LoI; TD.95007, Harlan Laboratórios, EUA). Além da ração, os camundongos receberam água potável suplementada com 0,02% de metimazol (MMI, Sigma-Aldrich (301507), EUA), perclorato de sódio a 0,5% (ClO₄⁻) (Sigma-Aldrich (310514), EUA) e 0,3% de sacarina como adoçante (Sigma-Aldrich (240931), EUA) (LoI / MMI / ClO₄⁻) Além disso, os animais hipotireoidianos receberam injeções via i.p. de PBS a cada 48 h, para evitar que diferenças comportamentais observadas não tenham sido decorrentes de diferenças na manipulação dos animais. A duração do procedimento em ambos tratamentos foi de 8 semanas, com início 3 semanas antes do ECBRI.

IV. Teste do ninho

Este teste visa mensurar a motivação espontânea dos animais, de modo que animais anedônicos teriam um baixo escore no teste. Este teste foi empregado antes do início do modelo de ECBRI e ao seu término. Para a execução deste experimento, os animais do grupo controle eram isolados 24 horas antes do teste, uma vez que os animais do grupo estresse são mantidos em isolamento durante todo o experimento. Uma hora antes da fase escura (fase ativa), neste estudo às 18 horas, um quadrado de algodão (5 x 5 cm, 2-3 g) foi colocado dentro da caixa. Após 24 horas, o estado do ninho foi avaliado, com base no seguinte score:

- Escore 1: O quadrado de algodão está intacto.
- Escore 2: O quadrado de algodão está parcialmente usado.
- Escore 3: O algodão está espalhado, mas não há forma de ninho.
- Escore 4: O algodão está recolhido mas não há ninho (“ninho plano”).
- Escore 5: O algodão está reunido em uma “bola” com uma pequena passagem para entrada do animal (como um iglu, com ou sem telhado).

Após o término do teste, os animais do grupo controle foram realocados em grupo, em suas respectivas caixas. Os animais do grupo estresse foram mantidos em suas caixas e o algodão utilizado no teste, removido.

V. Análise da escala de pelo

O pelo dos camundongos foi analisado semanalmente, tal que a pelagem de sete regiões foi avaliada: cabeça, pescoço, costas, abdome, cauda, patas dianteiras e patas traseiras, de modo que um score foi dado ao estado da pelagem:

- 0 (bom) - o pelo está liso e brilhante, sem pontos despenteados e pontiagudos.
- 0,5 (moderado) - pelo levemente fofo com alguns trechos espetados;
- 1 (ruim) - pelo macio com ligeira coloração.

Ao final, as pontuações de todas as partes do corpo foram somadas, para obter-se uma pontuação global, sendo a máxima desta, sete. Como a pelagem é resultado da frequência e extensão do comportamento de higiene, esta é uma medida da motivação do animal para atividades autocentradas, podendo ser utilizada para mensurar comportamento tipo depressivo.

VI. Teste de natação forçada

O teste de natação forçada consiste em colocar o animal no centro de um cilindro de acrílico (5 X12,5 cm) preenchido com 19 cm de água a 24 ± 2 °C, durante o tempo de 6 minutos, sendo medido o tempo de imobilidade e frequência de escaladas do animal nos últimos 4 minutos (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988; Skalisz *et al.* 2004; Raupp *et al.* 2008). O animal foi julgado imóvel quando parava de nadar e executava apenas movimentos mínimos apenas para permanecer flutuando com a cabeça acima do nível da água. Após o teste de cada camundongo, estes foram secos e colocados em ambiente aquecido, enquanto que a água do cilindro foi trocada ao término de cada teste. Os camundongos foram testados apenas ao final do modelo de ECBRI, sendo o último a ser executado, devido ao seu teor mais estressante aos animais. Nestes modelos de comportamento tipo-depressivo, no qual o animal é colocado em uma situação inescapável, uma diminuição da

tentativa de fuga (como escalada ou natação) e imobilidade aumentada indicam um tipo de desespero comportamental sob situações adversas.

VII. Caixa de locomoção espontânea

A atividade locomotora dos animais foi medida em uma caixa de madeira (40 x 20 x 26 cm), com piso de tela de arame, equipada com três sensores fotoelétricos no seu interior (10 cm de distância entre cada sensor) (Camarini et al., 1995). Foram realizados dois dias de teste, sendo que o primeiro dia foi apenas para a habituação dos animais ao ambiente de teste. Em ambos os dias os animais foram colocados, individualmente, nas caixas de movimentação por 20 minutos e o número de cruzamentos pelos sensores fotoelétricos, registrado. Ao término deste tempo, os animais foram removidos das caixas e realocados na gaiola. O número de cruzamentos foi considerado como índice de locomoção, que poder ser avaliado como indicativo de efeito sedativo/ excitatório. Este teste foi empregado antes do início do modelo de ECBRI (para estabelecer os parâmetros basais de locomoção) e ao término das cinco semanas de estresse.

VIII. Teste de esconder esferas

Os camundongos foram colocados individualmente em caixas de polipropileno (28x16x12 cm), idênticas às caixas moradia, forradas com 5 cm de cepilho e contendo 24 bolas de gude distribuídas periféricamente, igualmente espaçadas (Skalisz et al., 2004). Cada camundongo permaneceu 20 min na caixa, e ao final do teste o número de bolas enterradas foi computado. Considera-se cada esfera como enterrada quando o cepilho cobre ao menos 2/3. Não é ofertada água ou ração durante o experimento. Camundongos naturalmente apresentam o comportamento de enterrar/ esconder objetos desconhecidos, ou seja, o número de esferas enterradas é uma medida de comportamento tipo-ansioso.

IX. Teste do labirinto em cruz elevado

O aparelho consiste em um labirinto em forma de cruz (ou de Xis), elevado cerca de 50 cm do chão, com dois braços abertos e dois fechados, nas laterais e nas extremidades. Após o término de estresse crônico, os animais foram colocados individualmente na plataforma central de frente para um dos braços abertos do labirinto e o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos braços abertos

serão registrados, pelo período de 5 minutos. Considera-se entrada nos braços quando o animal entrar com as quatro patas dentro dos mesmos. Posteriormente, estes dados serão convertidos em nº de entradas nos braços fechados e % de tempo e nos braços abertos, dividindo o tempo gasto nos braços abertos pela soma do tempo gasto nos braços abertos + fechados (Lister, 1987). Variáveis etológicas (tentativas de entrada nos braços abertos, comportamentos de avaliação de risco, etc.) também serão registradas e analisadas (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2005). O número de entradas nos braços fechados foi considerado índice de atividade locomotora. O tempo nos braços abertos pode ser considerado para mensurar comportamento tipo-impulsivo, uma vez que o braço aberto é um estímulo aversivo ao animal. Sendo assim, pode-se considerar também que o aumento da exploração dos braços abertos demonstra diminuição de comportamentos de avaliação de risco.

X. Controle do peso corporal

Semanalmente, o peso dos animais foi coletado (no mesmo dia da análise de pelo), para controle do estado geral. Além disto, alterações na tireoide podem levar a mudanças drásticas no peso.

XI. Quantificação de hormônios tireoidianos

Três dias após o último experimento (teste do ninho), os animais foram anestesiados pela mistura de quetamina/ xilanzina para eutanásia. O sangue foi coletado através da veia cava pela Dra. Alexandra Acco, com seringa sem heparina, com o fim de precipitar o soro sanguíneo. Posteriormente, quatro horas após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, e em casos de amostras que não separaram o soro de forma eficiente, a centrifugação foi refeita. Em seguida, o soro foi coletado, realocado em novo eppendorf e imediatamente congelado em freezer -80 °C, até o envio das amostras para análise.

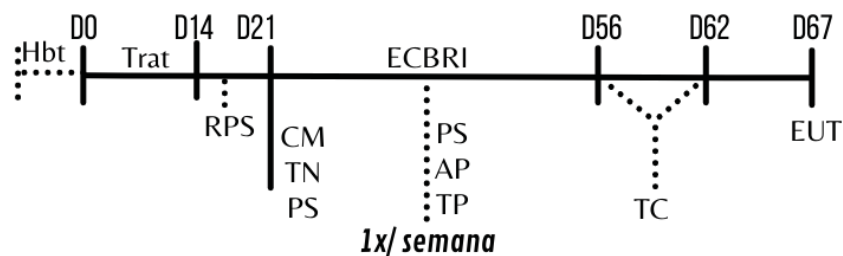
A análise de T3 e T4 foi realizada no Instituto Paranaense de Diagnósticos Veterinários (IPDV), em Umuarama, pelo método de quimioluminescência.

XII. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Sminork para verificar se os dados se enquadravam na distribuição normal. Os dados rejeitados pelo teste de distribuição foram transformados por raiz quadrada e logaritmização, permitindo que estes fossem analisados por testes estatísticos paramétricos. Os dados paramétricos foram

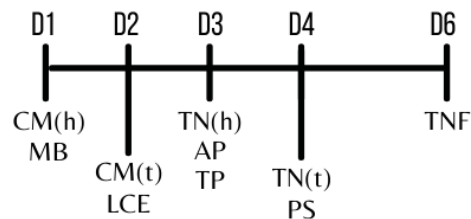
analisados teste t, ANOVA de uma ou duas vias, seguido do *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney U, para comparação de grupos independentes. Os dados expressam média+EPM (erro padrão da média). O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo em todos os dados analisados. Apenas os fatores e interações significativas serão mostrados, para facilitar a compreensão dos dados. As análises estatísticas foram executadas no programa Statistica.12.0 (StatSoft), e os gráficos montados no GraphPadPrism 7.0.

XIII. Delineamento experimental



Legendas:

Hbt - Habituação
 RPS - Randomização preferência de sacarose
 CM - Caixa de movimentação
 TN - Teste do ninho
 PS - Preferência de Sacarose
 ECBRI - Estresse Crônico Brando Repetido Imprevisível
 AP - Análise pelagem
 TP - Análise do peso
 TC - Testes Comportamentais
 MB - Teste de esconder esferas
 LCE - Labirinto em cruz elevado
 TNF - Teste de Natação Forçada
 EUT - Eutanásia
 (h) - habituação
 (t) - teste



4. Resultados

4.1. Primeira fase: Análise do transcriptoma

4.1.1. Classificação dos animais pelo teste de preferência de sacarose

A primeira distribuição dos animais foi feita de acordo com os seguintes parâmetros:

- Anedonia: Diminuição no consumo de sacarose;
- Refratário: Manutenção de consumo similar ao estado basal.

De acordo com tal classificação, o experimento contaria com 13 controles, 6 anedônicos e 8 refratários. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Tukey mostrou diferença significativa quanto à interação grupo e tempo ($F_{2,24}=5,04$; $p<0,01$) (Figura 1).

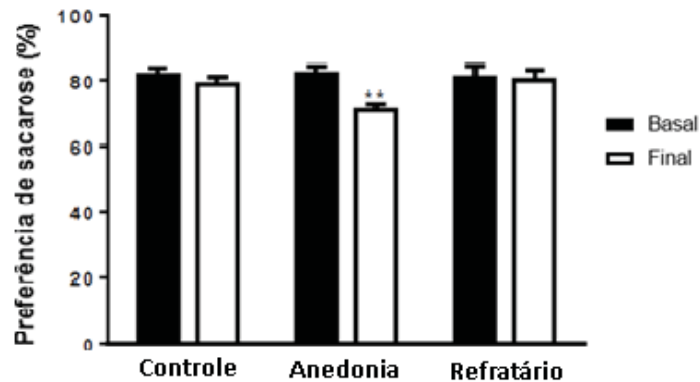


Fig1. Preferência de sacarose baseado na primeira divisão dos grupos, com uma abordagem tradicional de distribuição (controle = animais não estressados com ausência de mudança; anedonia = diminuição de consumo; refratário: ausência de mudança). N=6-13; $p<0,01$ comparado com valor basal.

Na segunda abordagem, um possível grupo maníaco foi adicionado. A nova classificação foi:

- Anedonia: Diminuição no consumo de sacarose maior que 15% do consumo basal; consumo basal baixo (inferior ou igual a 65%);
- Refratariedade: Manutenção de consumo similar ao estado basal (com pequena flutuação, não maior que 6%); consumo superior a 70% e menor que 80% quando submetido a estresse.
- Controle: Manutenção de consumo similar ao estado basal (com pequena flutuação, não maior que 6%); consumo superior a 70% e menor que 80% em ausência de estresse (exceto isolamento que é parte do protocolo).
- Mania: Aumento de consumo maior que 10% comparado com o basal quando exposto a estresse; consumo final superior a 85%.

De acordo com tal classificação, o experimento contaria com 7 controles, 6 anedônicos, 6 refratários e 7 maníacos. A ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Tukey mostrou uma diferença em grupo, por causa do baixo consumo do grupo anedônico em ambos os tempos medidos ($F_{3,23}=19,29$; $p<0,01$) (Figura 2).

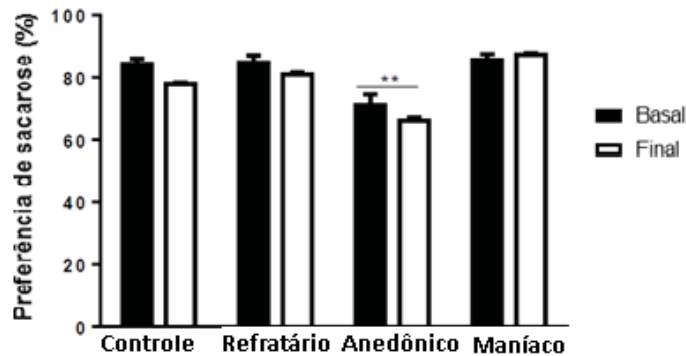
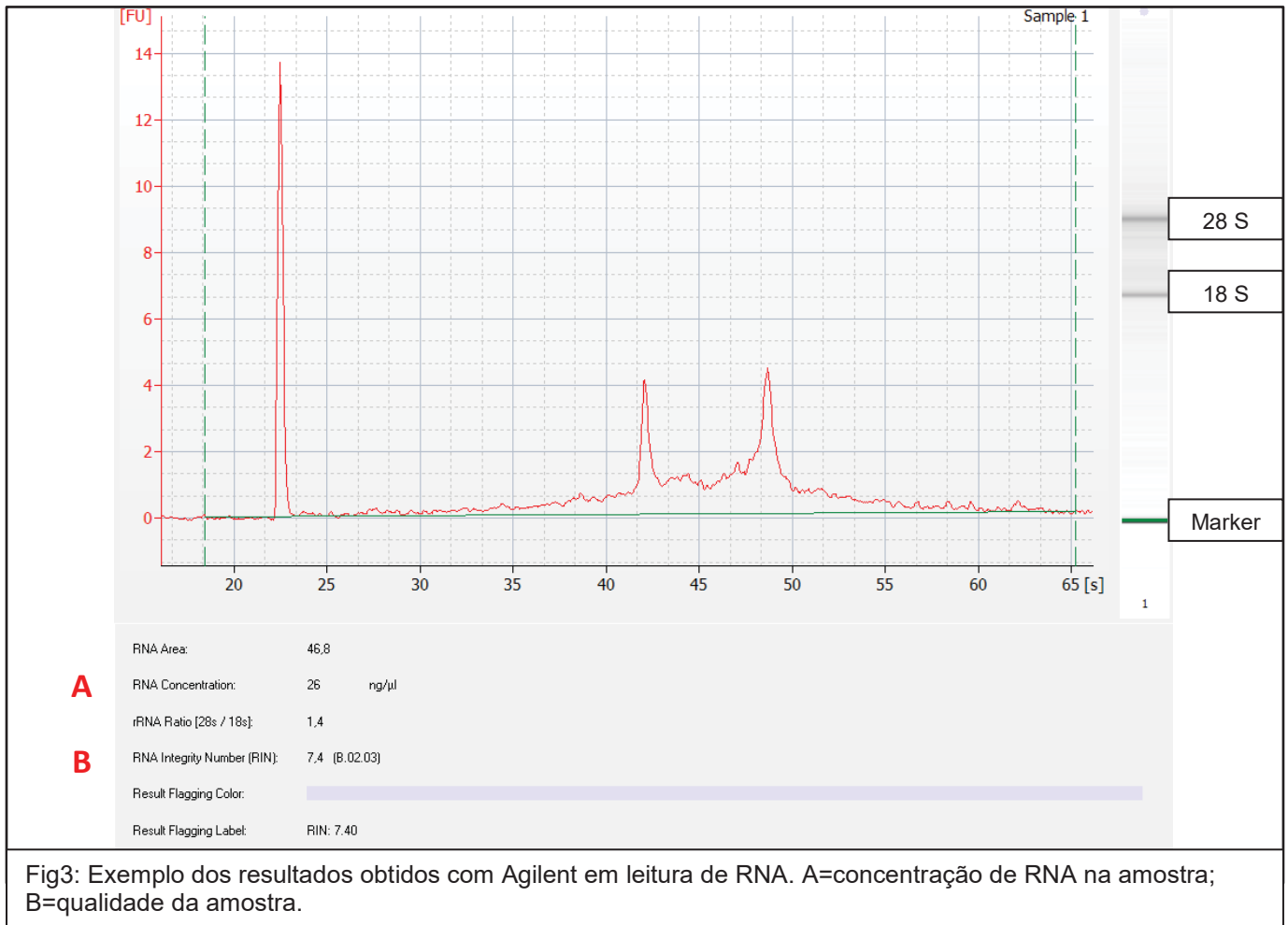


Fig2. Preferência de sacarose baseado na segunda divisão dos grupos, com uma nova abordagem de distribuição (controle = animais não estressados com ausência de mudança; anedonia = diminuição de consumo de pelo menos 15% ou consumo abaixo de 65%; refratoriedade = ausência de mudança, consumo entre 70 e 80%; mania = consumo superior a 85% ou aumento de consumo maior que 10%). N=6-7; $p<0,01$ comparado com valor controle.

4.1.2. Controle de qualidade das amostras

Para o controle de qualidade do RNA, as amostras foram testadas no Bioanalyser – Agilent. Este equipamento informa a concentração de RNA presente na amostra assim como a qualidade do material – RIN - este é sensível a degradação de RNA, que é medida com base nas ondulações presentes próximas a cada pico na leitura, sendo tais picos a representação da presença de RNA 28 e 18S (RNA ribossomal 18 e 28S – S representa Svedberg units, a unidade de taxa de sedimentação).

Uso de RNA degradado comprometeria a qualidade dos resultados, uma vez que é difícil definir então se o RNA não estaria sendo expresso ou se foi degradado a priori da análise. Assim sendo, RNA com qualidade abaixo de 6,7 seria eliminado da análise (valor estipulado pelo SciLife como um bom ponto de corte). Todas as amostras passaram neste controle e qualidade. A figura 3 mostra um exemplo dos resultados obtidos com o Agilent.



4.1.3. RNAseq

I. Controle de qualidade

Todas as amostras que passaram pelo primeiro controle de qualidade foram divididas em duplicata (duplicação técnica) e enviadas para o SciLife para execução do RNAseq. As amostras receberam nomenclatura especial para não ser possível diferenciação de grupos durante o sequenciamento. Todas as imagens de controle de qualidade apresentam esta nomenclatura, sem divisão de grupos, pois até a fase de expressão diferencial as amostras são tratadas em padrão “cego”.

Na tabela 1 é possível ver:

- A. DupRadar: uma classificação de taxa de duplicação nas amostras. Para genes com expressão alta é esperada uma taxa elevada de duplicação. Mas se a taxa de duplicação é alta em genes com baixa leitura, isso indica baixa complexidade da biblioteca;
- B. Percentagem de RNA ribossômico;
- C. % assigned e M Assigr: percentage de contagens e contagem em milhões unicamente mapeadas, respectivamente.

D. % Aligne and M Aligne: percentage alinhada a genoma de referência e contagem em milhões de bases alinhadas.

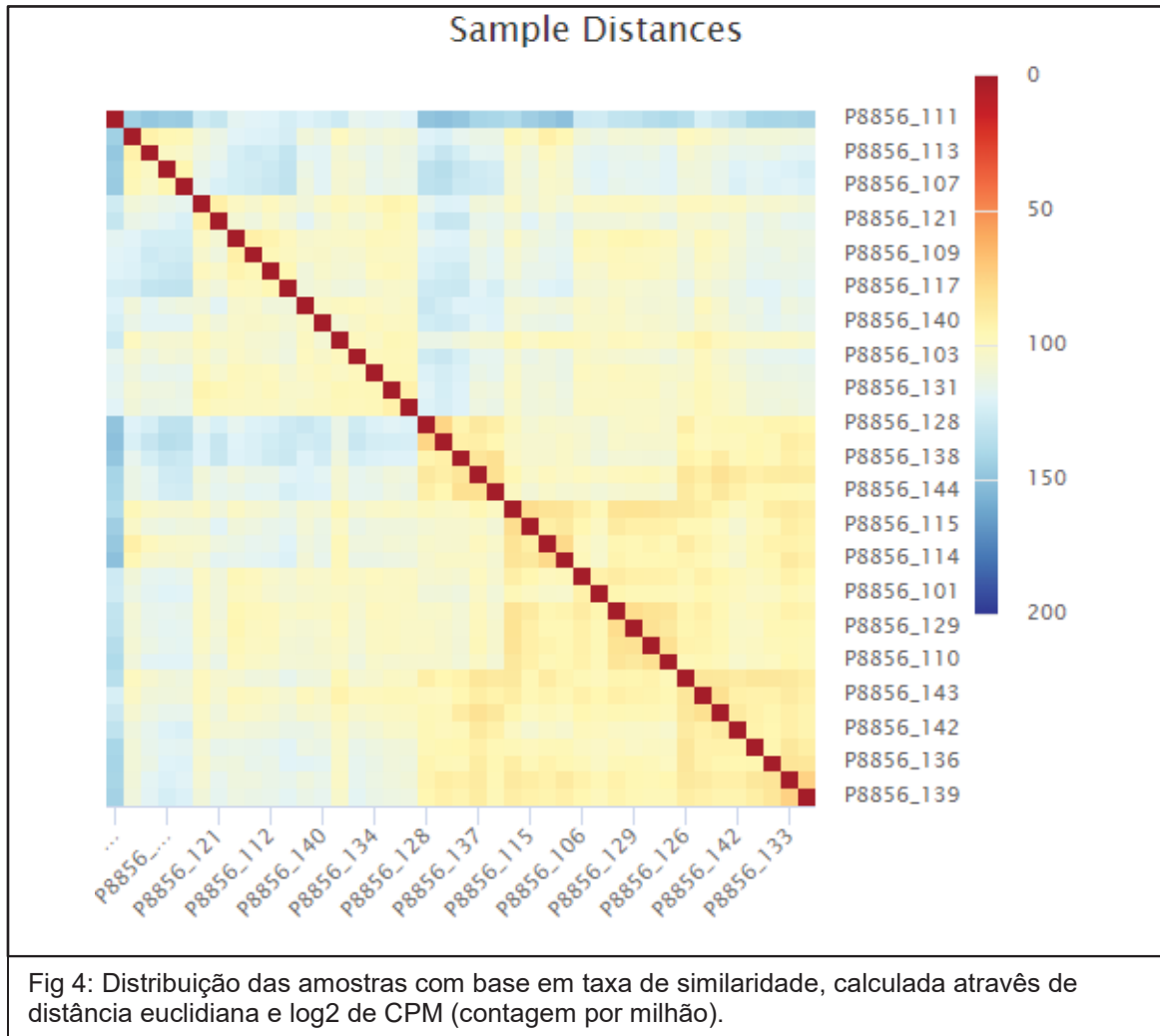
E. % Trim, Dups e GC: quando da amostra foi cortada e eliminada por causa de baixa qualidade, percentagem de duplicação e quantidade de GC.

F. M Seqs: tamanho total da sequência em milhões.

Tabela1: Resumo dos resultados de controle de qualidade.

Sample Name	dupRadar	Int % rRNA	% Assigned	M Assigr	% Aligne	M Aligne	% Trimm	% Dups	% GC	M Seqs
P8856_101	0,17	3,04	53	13	78,2	14,8	1,1	68,7	45	19
P8856_102	0,39	2,63	54	16,8	79,3	19	1,1	76,7	46	24
P8856_103	0,27	4,82	50,3	15,3	76,5	17,7	1,1	75,4	45	23,1
P8856_104	0,21	4,61	50,9	17,6	76,3	20,1	1,1	72,8	45	26,4
P8856_105	0,14	2,99	56	18,1	79,5	20	1,1	67,4	47	25,1
P8856_106	0,10	3,37	53,7	13,9	78	15,7	1,1	65,9	45	20,1
P8856_107	0,39	2,72	53,7	16,6	78,5	18,9	1,1	75,4	46	24
P8856_109	0,26	4,61	50,2	15,8	76,4	18,5	1,2	74,8	45	24,2
P8856_110	0,17	3,08	55,1	17,3	79,2	19,2	1,1	70,2	46	24,3
P8856_111	0,46	6,42	47,9	16,4	76,6	20,4	1,2	78,5	44	26,7
P8856_112	0,22	4,07	52,8	16,6	77,3	18,7	1,1	72,2	46	24,2
P8856_113	0,37	2,41	54,6	15,8	79,4	17,7	1,1	74,3	47	22,3
P8856_114	0,14	1,83	57,9	20,2	81,4	22,4	1,1	68,1	46	27,5
P8856_115	0,09	2,29	56	12,9	80,2	14,4	1,1	61,7	46	18
P8856_117	0,36	4,35	51,7	16,5	76,8	18,9	1,1	76,8	45	24,6
P8856_118	0,29	2,66	53,9	18,5	79	20,8	1,1	76,2	46	26,3
P8856_119	0,22	1,61	59,6	21,6	81,9	23,6	1,1	72,4	47	28,9
P8856_120	0,11	2,15	56,4	18,6	80,5	20,7	1,1	65,6	47	25,7
P8856_121	0,76	1,91	57,2	39,4	81,3	44,3	1,1	83,8	48	54,5
P8856_122	0,11	1,89	59,1	20	82,3	22	1,1	66,3	46	26,8
P8856_123	0,17	2,47	55,8	19,7	80	22,1	1,1	68,3	46	27,7
P8856_125	0,33	4,08	52,6	16,8	78,1	19,3	1,1	76,5	46	24,7
P8856_126	0,25	1,6	58,4	22,5	82	25	1,1	73,6	47	30,5
P8856_127	0,32	2,08	57,1	18,5	81,3	20,8	1,1	75,5	47	25,6
P8856_128	0,12	1,62	59,9	20,3	82,8	22,4	1,1	66,2	48	27
P8856_129	0,09	2,5	56,1	15,4	80,5	17,3	1,1	60,6	47	21,5
P8856_130	0,24	3,28	53,5	17,1	79	19,6	1,1	72,1	46	24,9
P8856_131	0,29	3,98	53,5	18,2	78,5	20,8	1,1	74,5	46	26,5
P8856_132	0,22	1,68	58,1	15,1	81,8	16,9	1,1	69,6	46	20,7
P8856_133	0,12	1,67	59,1	20,2	82,5	22,4	1,1	68	46	27,2
P8856_134	0,22	4,01	52,2	13,9	78	15,9	1,1	72,7	46	20,4
P8856_135	0,22	3,23	53,5	21,8	78,6	24,7	1,1	74,8	46	31,5
P8856_136	0,29	1,56	59,5	18,6	82,2	20,7	1,1	69,9	48	25,1
P8856_137	0,14	1,96	57,6	20,5	81,4	22,7	1,1	68,1	47	27,9
P8856_138	0,10	2,18	57,2	19,5	81,3	21,8	1,1	66,7	46	26,8
P8856_139	0,26	1,6	59,9	22,5	82,6	24,8	1,1	70,6	47	30
P8856_140	0,43	4,21	51,9	16	77,1	18,3	1	78,4	45	28,8
P8856_141	0,34	5,8	48,6	20,2	74,6	23,5	1,1	79,1	44	31,5
P8856_142	0,37	2,22	56,6	22,2	81	24,8	1,1	77,5	47	30,7
P8856_143	0,25	3,63	53	20,9	78,1	23,8	1,1	75	46	30,5
P8856_144	0,21	2,09	57,1	20,1	81,2	22,5	1,1	71	47	27,7

Na figura 4, é possível observar a taxa de similaridade entre amostras que pertencem ao mesmo grupo. Para geração deste gráfico, a contagem per gene foi normalizada usando o pacote edgeR e a distância euclidiana entre os valores normalizados de log2 de CPM (contagem por milhão) foram então calculados e divididos em grupos.



No controle de qualidade é possível ver a composição de cada amostra para diferentes tipos de RNA. Como esperado, a grande maioria do RNA é relacionada com RNA que transcreve para proteínas. Uma pequena percentagem é caracterizada por RNA antisense, ribossomal e pseudogenes. Mas isto é normalmente observado em experimentos de RNAseq. Poucas amostras apresentaram miRNA (micro RNA ou RNA de interferência), portanto estes não foram analisados separadamente, mesmo que sejam importantes, os valores foram muito baixos.

Em resumo, as amostras apresentaram qualidade acima de 36 (valores acima de 30 são considerados bons), e referente à cobertura, esta foi de aproximadamente 98% (também uma boa taxa). Pode-se concluir que a maioria das amostras apresentou boa qualidade e, portanto, foi usada para alinhamento e posterior análise de expressão diferencial.

II. Alinhamento

O alinhamento das amostras foi feito usando o pacote “STAR”. As configurações utilizadas foram configurações padrão e o genoma de referência foi “mouse” (*Mus musculus*, GRCm38).

Mais detalhes do protocolo de alinhamento podem ser encontrados em: <https://github.com/SciLifeLab/NGI-RNAseq>. Nesta página no github pode ser encontrado o código completo para alinhamento.

Após a obtenção da taxa de alinhamento, análises foram executadas em sequências mapeadas em posição única ou múltipla.

III. Contagem de expressão

O passo seguinte é a contagem de genes em cada amostra (BAM files – resultado do alinhamento no genoma de referência). Esta contagem foi feita usando HISAT2. Os parâmetros foram:

```
Reference organism: Mus_musculus_GRCm38,83;  
BAM file type: single ended;  
Mode to handle reads overlapping more than one feature: union;  
Minimum alignment quality: 10;  
Feature type to count: exon.
```

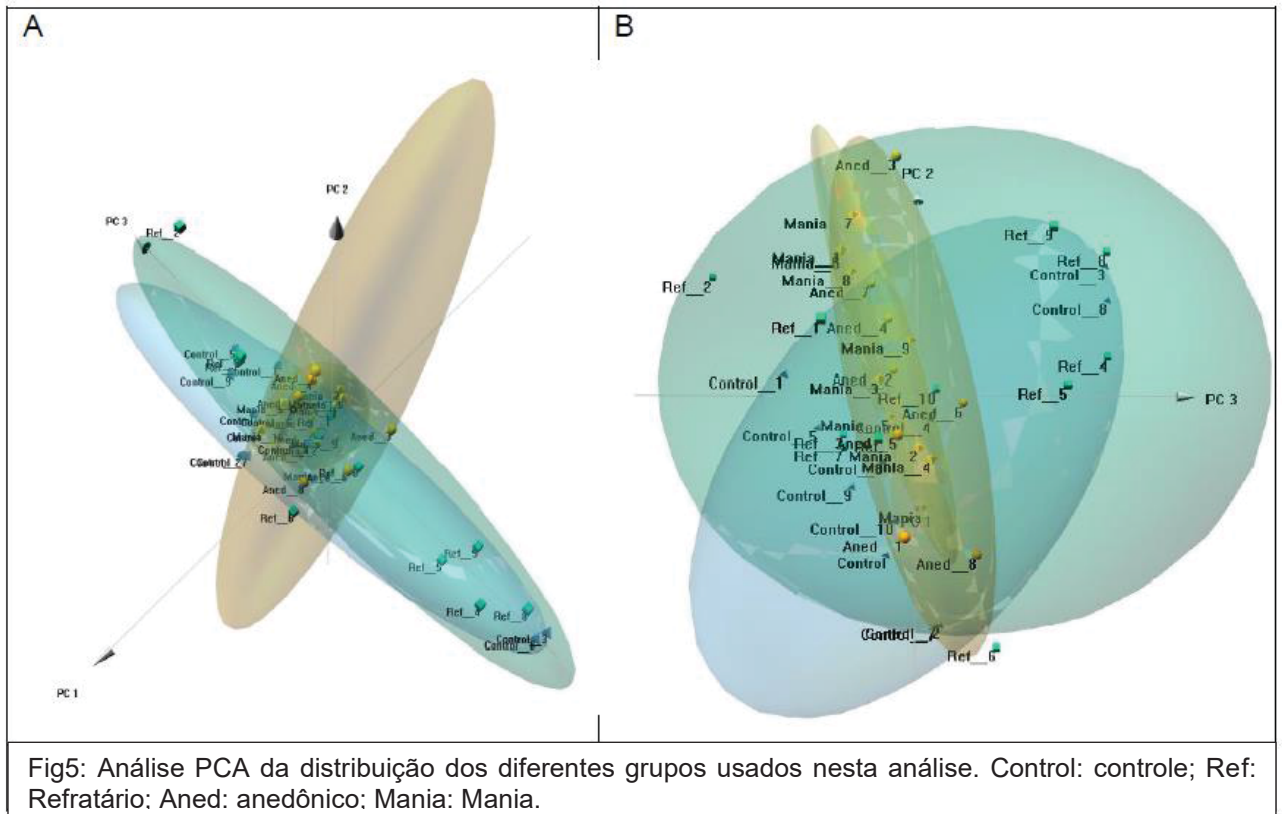
O resultado desta contagem é uma tabela com os valores de contagem de cada amostra. O passo seguinte foi a divisão das amostras em diferentes grupos. Para tanto uma tabela de metadata foi feita, nesta tabela cada resultado da contagem foi colocado em um grupo, de acordo com a divisão de grupos obtida na preferência de sacarose. Por serem extensas (47096 linhas x 21 colunas por pares), tais tabelas não serão apresentadas neste trabalho.

Os dados foram divididos em pares para as análises seguintes, uma vez que todas as análises passaram por análise de FDR (false discovery rate): Controle x Anedônico; Controle x Refratário; Controle x Mania; Refratário x Anedônico, Refratário x Mania; Anedônico x Mania.

IV. Análise de componente principal (PCA)

Para a visualização da dispersão das amostras dentro de cada grupo, PCA análise foi feita usando R. O pacote utilizado em R foi pca3d. Os resultados mostraram uma similaridade clara entre os grupos controle e refratário, também uma similaridade clara entre os grupos anedônico e maníaco.

Poucos genes diferem os grupos refratário e controle, bem como os grupos maníaco e anedônico (figura 5a-b). As significâncias de cada componente foram: PCA1: 28%; PCA2: 9% e PCA3: 5%.



V. Expressão diferencial

A análise de expressão diferenciada foi feita utilizando edgeR. Para tanto, a tabela com as contagens e a tabela de metadata (mostrando divisão de grupos) foi utilizada. Os parâmetros usados na análise foram:

Filter out genes which don't have counts in at least X samples: 4;

P-value cutoff: 0,05

Multiple testing correction: BH (Yosef Hochberg test for FDR – false discovery rate)

Dispersion method: tagwise

Apply TMM (trimmed mean value) normalization: yes

O resultado obtido é uma tabela com o número total de genes com expressão diferenciada em relação aos diferentes grupos. A tabela 2 mostra o número total de genes expressos diferencialmente para cada comparação. Aqui foi considerado como expresso de maneira diferenciada genes que apresentaram um adjPval significativo (adjPval – p value ajustado pelo método BH, $\text{adjPval} < 0,05$). Neste estudo, serão abordadas detalhadamente a expressão diferencial entre os grupos controle X anedônico, controle X maníaco e

maníaco e anedônico, pois algumas expressões diferenciais observadas é o maior interesse para a bateria de testes comportamentais.

Tabela 2: número de genes diferencialmente expressos nos diferentes grupos.

Grupo	Número de genes
Controle x anedônico	155
Controle x maníaco	196
Controle x refratário	11
Refratário x anedônico	14
Refratário x maníaco	115
Maníaco x anedônico	14

VI. “Enrichment pathway analysis”

Após realizar o teste de expressão diferenciada, a lista de genes que apresentaram adjPval significativos foram utilizadas para “enrichment pathway analysis”. Esta análise foi realizada utilizando o software Gsea (Subramanian et al., 2005; Mootha et al., 2003) e o site EnrichR (Chen et al., 2013; Kuleschov et al., 2016).

Para o software Gsea, os parâmetros utilizados foram:

MSigDB Collections: c5.bp.v6

Reference genome: ENSEMBL gene mouse

Number of permutations: 5

Consider pathways with at least X genes: X = 5

P-value cut-off: 0,05

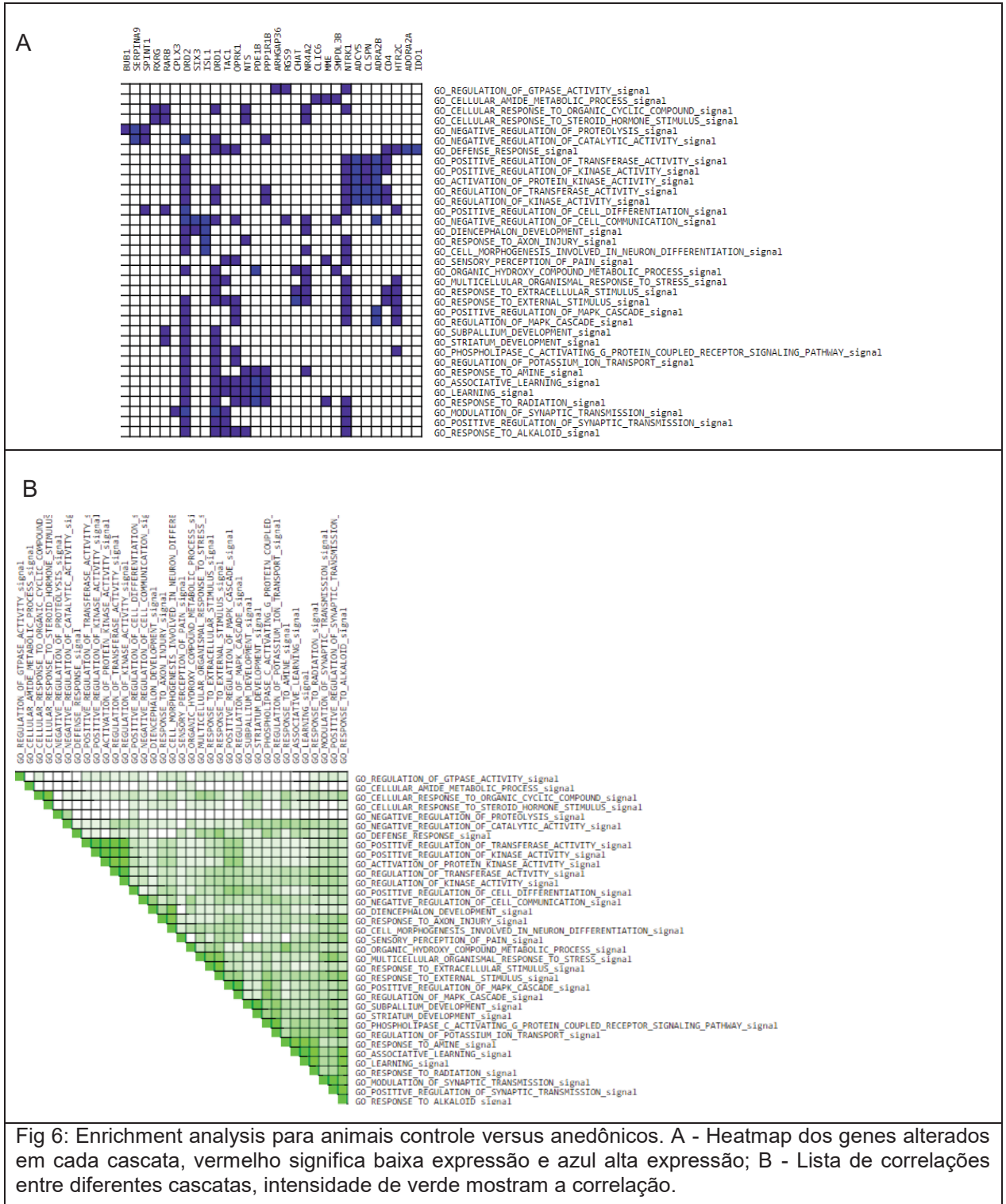
FDR q.value cut-off: 0,25

Seguido de uso de EdgeR para análise do peso de cada “pathway” e finalmente, criação de “enrichment pathway” utilizando Cytoscape.

Para o site EnrichR a mesma lista de genes foi checada em relação à “Ontology - >Jensen DISEASES”.

a. Controle versus anedonia

Quando comparados animais controle e anedônicos um total de 155 genes foram expressos diferencialmente. Usando Gsea, os “pathways” (cascatas) expressos diferencialmente foram estabelecidos. Dos 155 genes, 30 foram classificados como significativos (figuras 6a e 6b).



A lista de genes obtida foi utilizada para criação de “enrichment pathway” (via de enriquecimento) usando “cytoscape”. Nesta análise a correlação entre diferentes cascatas biológicas (quantas ligações elas têm entre si) são demonstradas pela grossura da conexão e o tamanho dos círculos que representam cada Go-term (“biological pathway”) apresentam diferentes tamanhos de acordo com a quantidade de conexões que estas apresentam (figura 7).

Dentre as cascatas biológicas, as mais significativas foram: ritmo circadiano, reprodução, locomoção, ativação celular, transmissão sináptica, visão, aprendizado, percepção visual, resposta a estímulos internos e metabolismo.

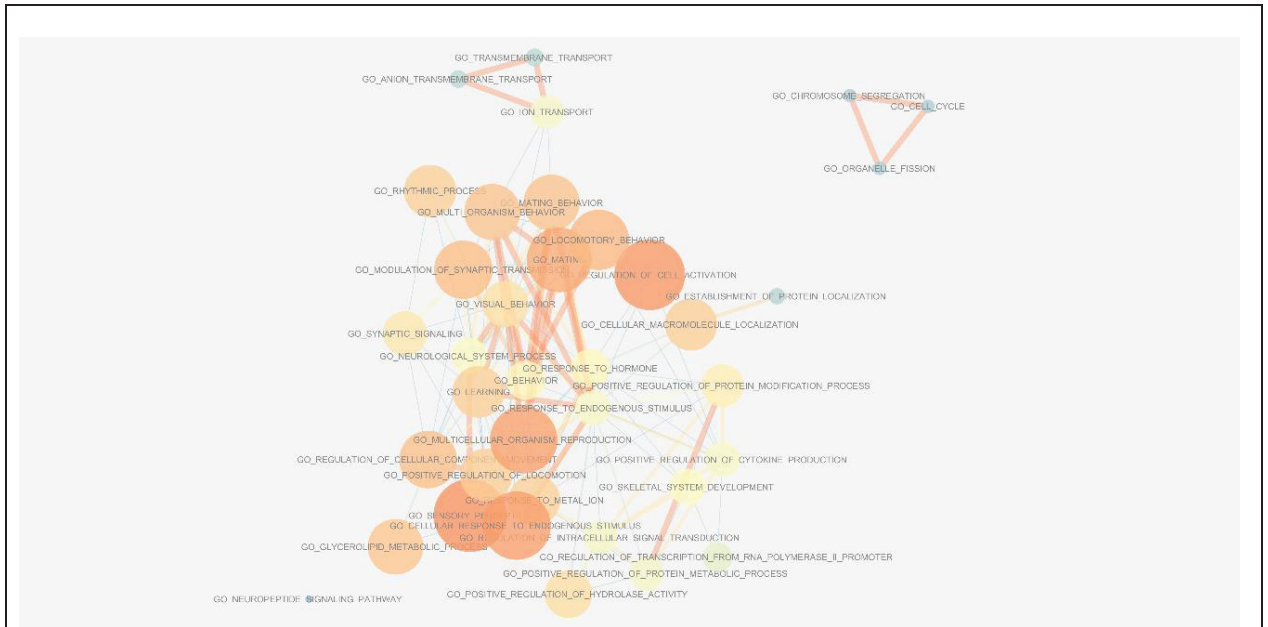


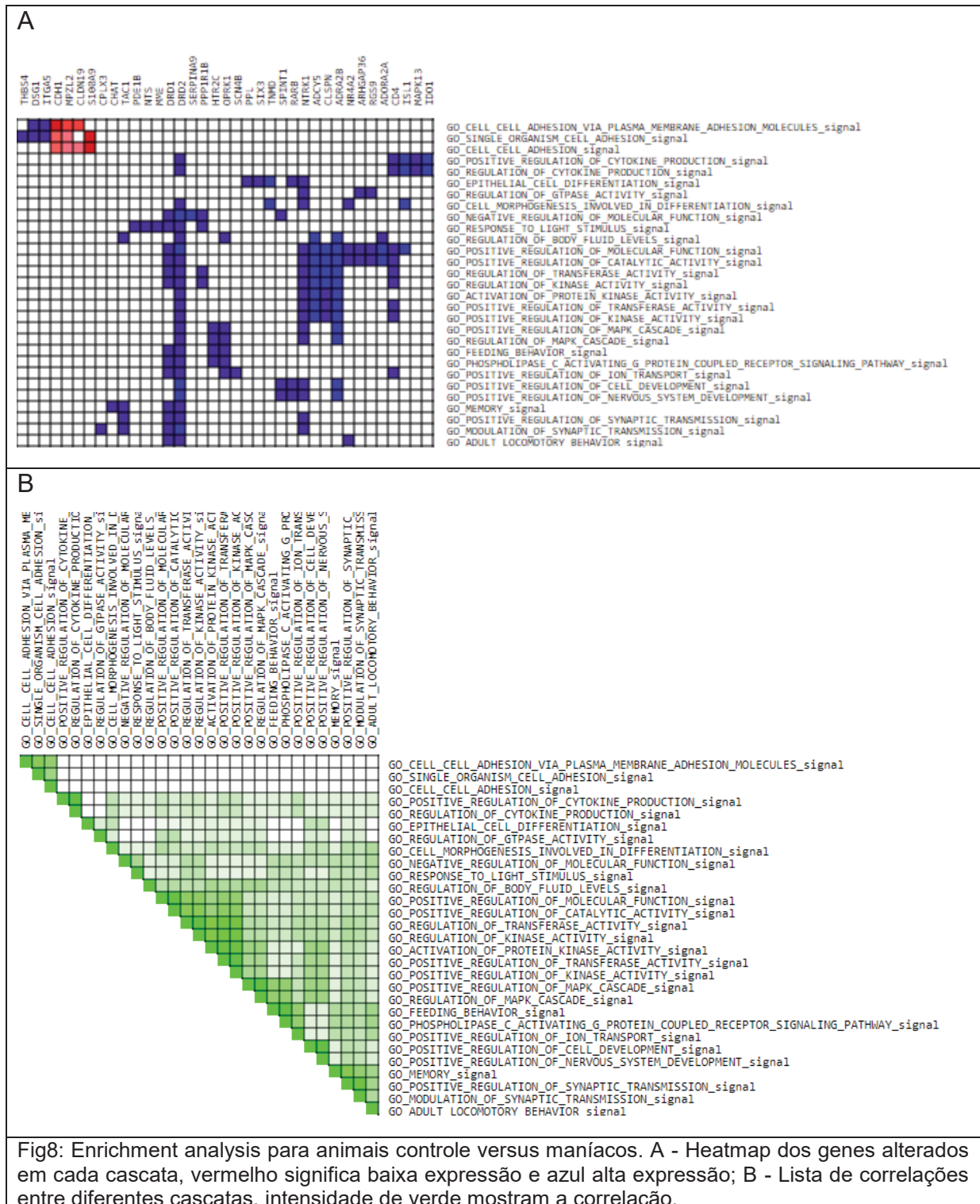
Fig 7: Análise das vias das cascatas biológicas diferencialmente ativadas quando comparados animais controle e anedônicos. O tamanho do círculo e cor (laranja alta e azul baixa) mostra a riqueza de conexões da cascata (em relação às cascatas relevantes nesta comparação) e a grossura da conexão a relevância desta.

Para finalizar, os genes significativos foram analisados quanto à ontologia de doenças usando Enrichr. Nesta lista, as doenças mais significativas foram:

- A – Agnosia da dor, Huntington, amnésia, ansiedade, câncer na pituitária, dependência de álcool e diarreia.
- B – Albinismo ocular, artrite, Síndrome de Fanconi, câncer de bexiga, doença na íris, adição a jogo.

b. Controle versus mania

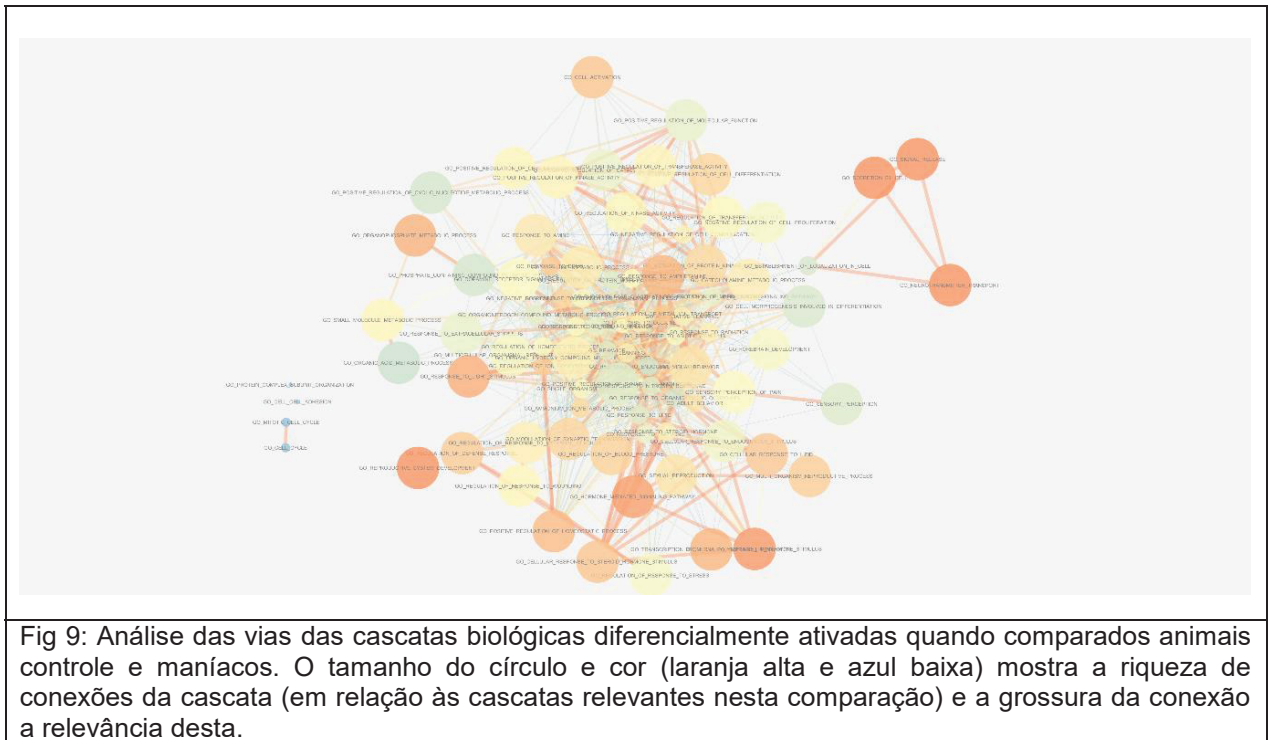
Quando comparados animais controle e maníacos, um total de 196 genes foram expressos diferencialmente. Através do Gsea, as cascatas expressas diferencialmente foram estabelecidas. Dos 196 genes, 37 foram classificados como significativos. Figura 8a e b mostram as análises de gene x cascata e correlação de cascatas.



A lista de genes obtida foi utilizada para criação de da via de enriquecimento usando “cytoscape”. Nesta análise a correlação entre diferentes cascatas biológicas (quantas ligações elas têm entre si) demonstrou quais resultaram em maior alteração de genes (Figura 9).

Dentre as cascatas, as mais significativas foram: transporte de neurotransmissor, sinalização celular, secreção celular, resposta a luz, resposta celular a lipídio, reprodução,

resposta a estresse, resposta celular a esteróides, cascata mediada por hormônios, metabolismo de organofosfatos, metabolismo de ácidos orgânicos e pequenas moléculas, atividade de quinases, metabolismo de catecolaminas, adição à anfetamina e cocaína e resposta a estímulos extracelulares.



Para finalizar, os genes significativos foram analisados quanto à ontologia de doenças usando Enrichr. Nesta lista, as doenças mais significativas foram:

A – Huntington, abuso de drogas, alcoolismo, agnosia da dor, compulsão alimentar, adenoma da pituitária.

B – Gastrite, câncer de estômago, diabetes, melancolia, inflamação da tireoide, pseudohipoparatiroidismo e hepatite autoimune.

c. Refratário versus mania

Quando comparados animais refratários e maníacos um total de 115 genes foram expressos diferencialmente. Nesta análise, o grupo tomado como basal (“controle”) foi o grupo refratário. Usando Gsea, as cascatas expressas diferencialmente foram estabelecidas. Como é possível notar, dos 115 genes, 37 foram classificados como significantes. Figura 10a e b mostram as análises de gene x cascata e correlação de cascatas.

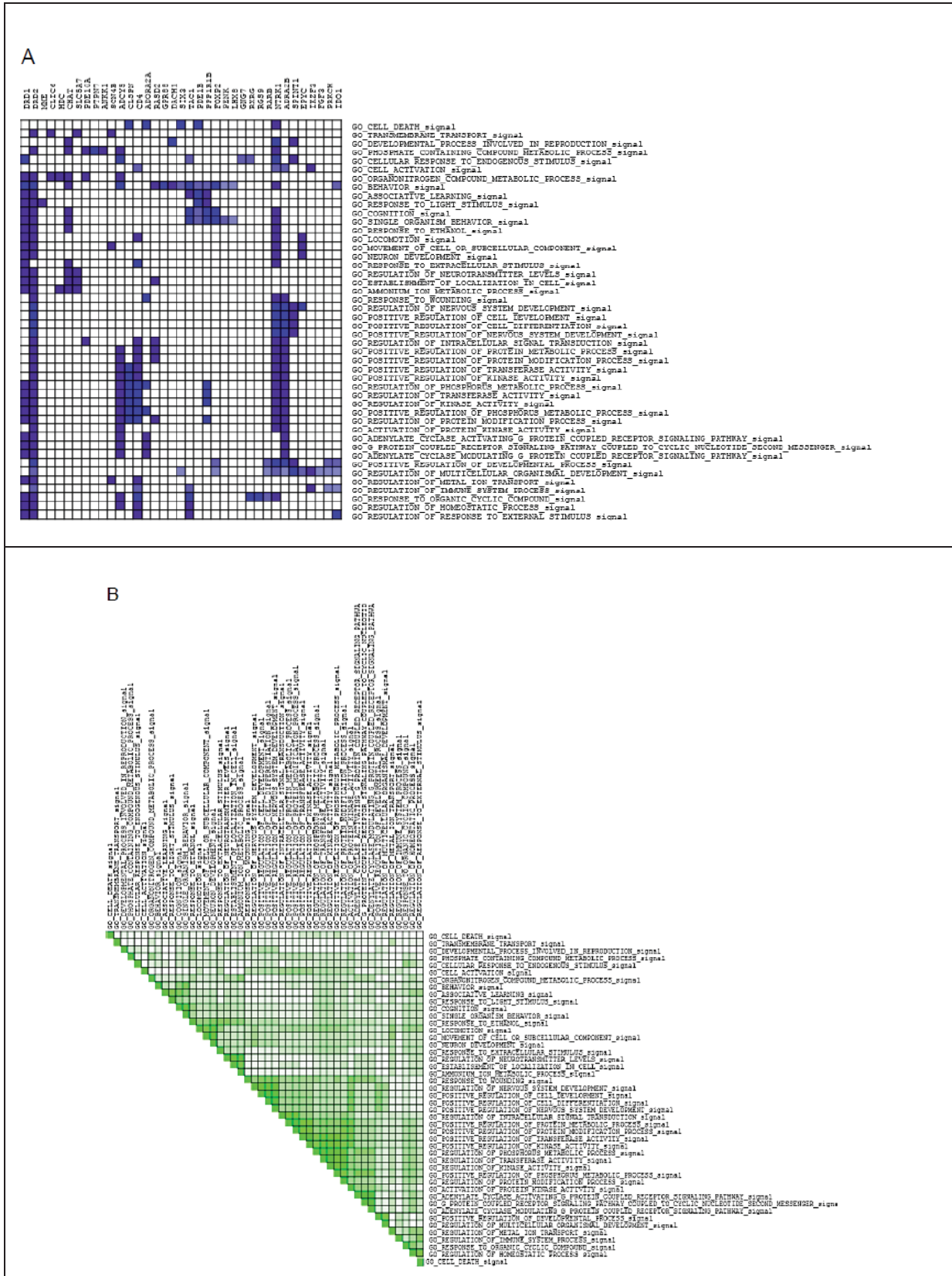


Fig10: Enrichment analysis para animais refratários versus maníacos. A - Heatmap dos genes alterados em cada cascata, vermelho significa baixa expressão e azul alta expressão; B - Lista de correlações entre diferentes cascatas, intensidade de verde mostram a correlação.

Esta lista de genes foi utilizada para criação de enrichment pathway usando cytoscape. Nesta análise a correlação entre diferentes cascatas são demonstradas pela grossura da

Tabela 3: Levantamento de funções de genes expressos diferencialmente entre animais maníacos e anedônicos.

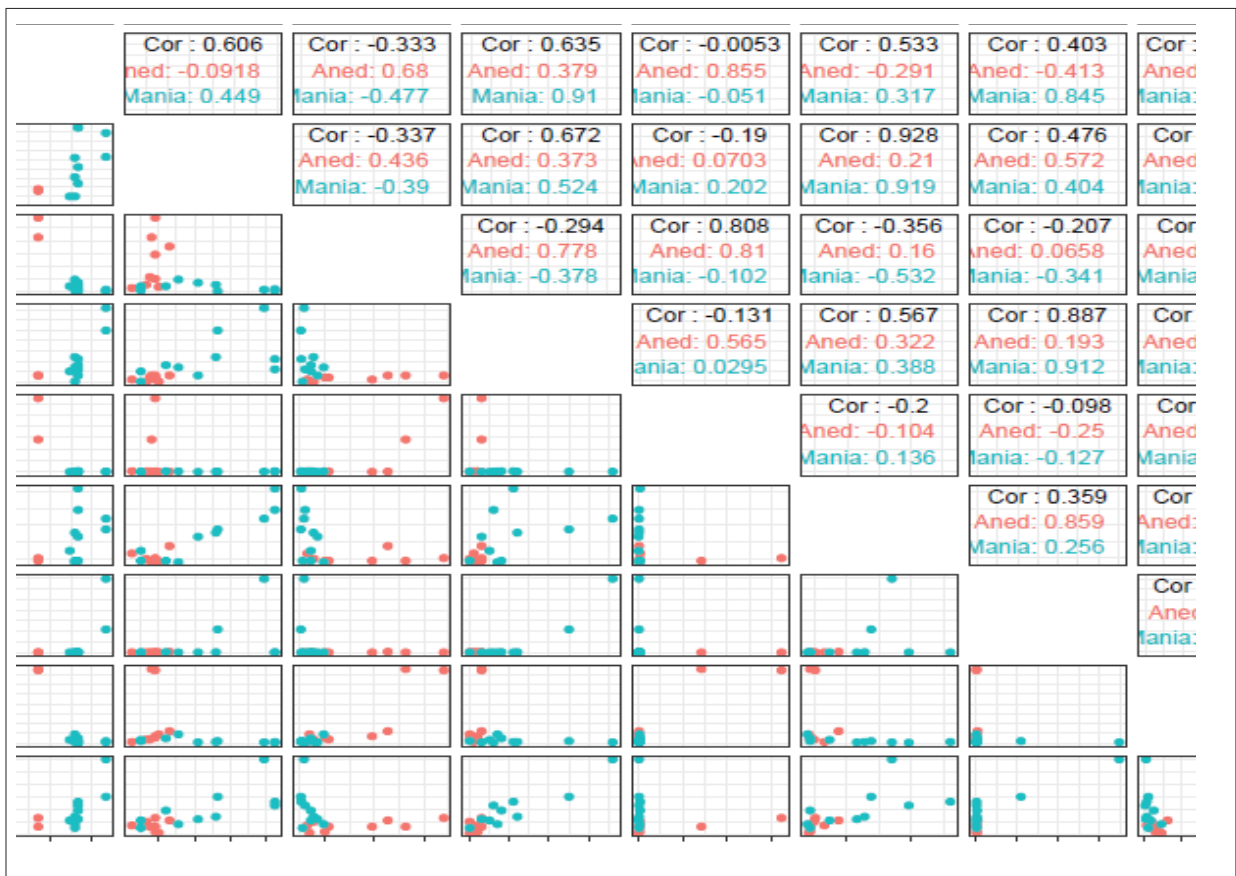
Gene	Fold #	Function	Source
Myo3b	1,51	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway; Cytoskeletal regulation by Rho GTPase pathway; Acquired_metabolic_disease; Interactions with Hub proteins GRB2 and ESR2; Knockdown Myo3b is related to abnormal sleep behaviour and convulsion.	Panther 2016 Panther 2016 Jensen Disease PPI Hub proteins MGI Mammalian Phenotype 2017
Lrrc71	2,74	Associated with the histone modification H3 and 4; Coexpression with TFs (HIPK1, MAK, MAPK15, MOK, NEK10, NEK11, NEK5, MAP3K19, ANKK1, ERN2, STK36).	Epigenomics Roadmap HM ChIP-seq ARCHS4 Kinases Coexp
Trh	1,07	Thyroid hormone signalling pathway; Neuroactive ligand-receptor; Interaction with Hub proteins (C1ORF103, MAPK3, MAPK1, HDAC3, HDAC2, TP53, NCOR1, GROL, SRC, ESR1); Related to Hyperthyroidism.	Kegg 2016 Kegg 2016 PPI Hub Proteins Jensen DISEASES
Oxt	5,12	Oxytocin signaling pathway; Opioid prodynorphin pathway; Vasopressin synthesis.	Kegg 2016 Panther 2016 Panther 2016
Hdc	1,64	Metabolic pathways; Histidine metabolism pathway; Cholecystinin (CCKR) signalling map ST pathway.	KEGG 2016 KEGG 2016 Panther 2016
Gal	2,71	G alpha (i) signalling events; GPCR ligand binding pathway; Class A/1 (Rhodopsin-like receptors) pathway; GPCR downstream signalling pathway; Related to hepatitis; Decreased insulin secretion.	Reactome 2016 Reactome 2016 Reactome 2016 Reactome 2016 Jensen Disease MGI Mammalian Phenotype 2017
Gm34302	4,62	Protein enhances the activity of ATP2A1/SERCA1 ATPase in sarcoplasmic reticulum by displacing ATP2A1/SERCA1 inhibitors, thereby acting as a key regulator of skeletal muscle activity.	alliancegenome.org/gene/ AND http://www.uniprot.org/uniprot/P0DN83
Bmp6	1,08	TGF-beta signaling pathway; Hippo signaling pathway.	KEGG 2016 KEGG 2016
Sytl4	3,11	Positive regulation of Wnt protein secretion; Vesicle fusion with vacuole; Negative regulation of calcium ion-dependent exocytosis.	GO Biological Proc 2017b GO Biological Proc 2017b GO Biological Proc 2017b
Irs4	3,57	cGMP-PKG signaling pathway; Regulation of lipolysis in adipocytes pathway; Longevity regulating pathway; FoxO signaling pathway.	Kegg 2016 Kegg 2016 Kegg 2016 Kegg 2016

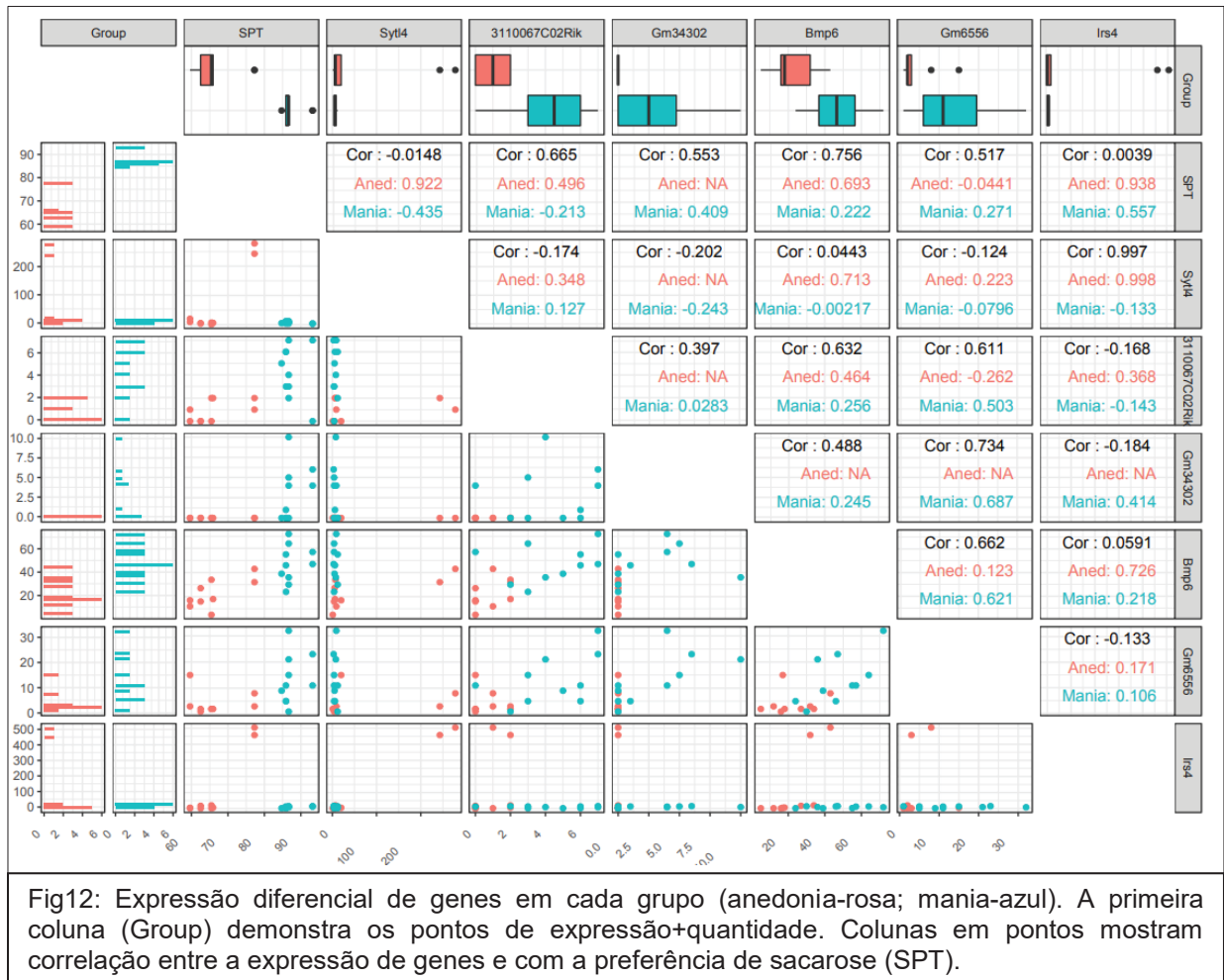
Estes resultados apontam para uma tendência a alterações metabólicas nos animais maníacos, bem como alterações na homeostasia da atividade da insulina. Foi também possível ver que alterações de sono estão presentes, bem como aumento de inflamação e diminuída longevidade. Todas estas características são presentes em pacientes maníacos, de acordo com a literatura (Goldstein et al., 2009; Holmes et al., 2009; Strakowski et al.,

2010). Resultados corroboram esta ideia de disfunção metabólica foram observadas em “MGI Mammalian Phenotype 2017 in EnrichR”.

Embora diversos fatores relacionados a mudanças na expressão de genes poderiam ser explorados no presente trabalho, ênfase será dada às diferenças na expressão de genes relacionados à função tireoidiana, estas observadas quando comparados animais anedônico e maníacos.

Poucos genes apresentaram expressão diferencial quando comparamos estes dois grupos (total de 14), assim como no caso de refratário e controle. Animais anedônicos apresentaram aumento de 10% em Trh (gene prepro-TRH=hormônio liberador de pro-tirotrópina). Este gene que transcreve para o TRH é responsável, como citado anteriormente, por estimular o TSH, que por sua vez estimula a liberação de T3 (Figura 12).





Portanto, é possível dizer que, com base no aumento observado na transcrição de Trh, animais depressivos apresentam uma alteração na atividade dos hormônios tireoidianos em comparação aos maníacos. Em resumo, alterações metabólicas são presentes em ambos os grupos. Os resultados indicam que a função tireoidiana pode estar associada ao desenvolvimento de diferentes respostas comportamentais ao estresse repetido. Em vista disso, propôs-se a avaliação da relação entre a atividade tireoidiana e comportamental em camundongos de ambos sexos, submetendo-os à associação entre modelos de depressão e modelos de indução de disfunção tireoidiana.

4.2. Avaliação comportamental vs. Função tireoidiana

4.2.1. 1ª bateria – Machos e fêmeas submetidos ao ECBRI

I. Preferência de sacarose

Os animais foram submetidos a 5 semanas de estresse brando repetido para indução de alterações comportamentais; A partir da preferência de sacarose basal os animais foram randomizados (randomização estratificada) em grupo controle e grupo estresse e

semanalmente foi realizado o teste de preferência de sacarose como parâmetro para análise da preferência individual dos animais. A classificação consiste em medir a diferença percentual entre o consumo basal e consumo final, além do consumo médio de cada animal, conforme detalhado no tópico 4.1.1. Devido à nova classificação, foi necessária a transformação logarítmica dos dados para adequar os valores à distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov), permitindo a realização de testes paramétricos. A primeira bateria de testes consistiu na exposição de camundongos Swiss apenas ao modelo de ECBRI, para estabelecer qual seria a classificação basal destes animais. Além disto, possíveis diferenças basais entre machos e fêmeas foram observadas.

Os machos apresentaram média de consumo basal menor de cerca de 80%. Tal classificação resultou em 17 controles, 14 refratários, 13 maníacos e 2 anedônicos (n=46). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey demonstrou diferenças significativas no grupo anedônico, comparando sua medida final com todos os outros grupos. Fator classificação ($F_{3,44} = 7,3$; $p < 0,001$), fator tempo ($F_{1,44} = 8,2$; $p < 0,01$) e interação classificação X tempo ($F_{3,44} = 54,0$; $p < 0,001$) (Figura 13).

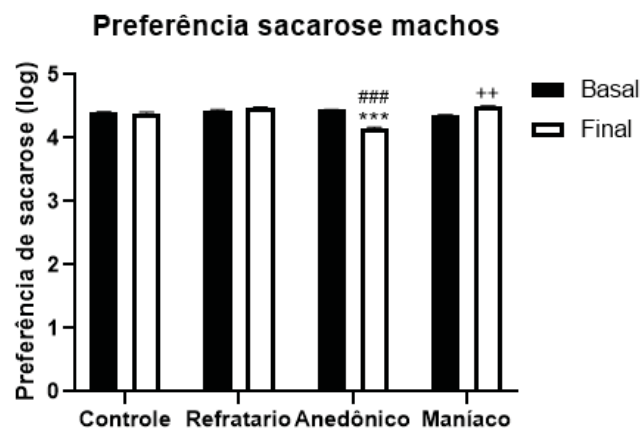


Fig 13. Preferência de sacarose em machos antes (basal) e após (final) ao ECBRI, com nova abordagem de distribuição (anedonia = diminuição de consumo de pelo menos 15% ou consumo abaixo de 65%; refratariedade = ausência de mudança, consumo entre 70 e 80%; mania = consumo superior a 85% ou aumento de consumo maior que 10%). Dados representam média \pm SEM; N=13-17 (controle, refratário, maníaco) / N=2 (anedônicos); *** $p < 0,001$ comparado a medida basal dos anedônicos. #### $p < 0,001$ quando comparado à medida final dos grupos restantes. ++ $p < 0,003$ quando comparado à medida final do grupo controle. Dados foram transformados por logaritmização.

Através da preferência de sacarose, foi possível observar que as praticamente todas as fêmeas desta bateria apresentavam consumo basal alto, com preferência geralmente maior do que 85%. Sendo assim, foi possível observar que quase todas as fêmeas foram classificadas com comportamento maníaco (n=41). O grupo controle tinha n=3, e refratários n=6 (n_{total}=50). Apesar da diferença significativa observada na medida final do grupo refratário, sua classificação não é comprometida, pois não houve diferença significativa em

relação ao grupo controle. ANOVA de medidas repetidas seguida de post-hoc de Tukey mostrou diferença na medida final do grupo refratário. Fator classificação ($F_{2,47} = 3,3$; $p < 0,03$), fator tempo ($F_{1,47} = 4,2$; $p < 0,05$) e interação classificação X tempo ($F_{2,47} = 10,1$; $p < 0,001$) (Figura 14).

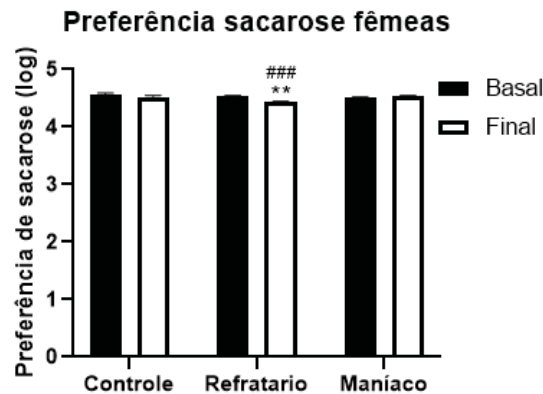


Fig 14. Preferência de sacarose em fêmeas antes (basal) e após (final) ao teste de ECBRI, com nova abordagem de distribuição (anedonia = diminuição de consumo de pelo menos 15% ou consumo abaixo de 65%; refratariedade = ausência de mudança, consumo entre 70 e 80%; mania = consumo superior a 85% ou aumento de consumo maior que 10%). N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Dados representam média \pm SEM; ** $p < 0,001$ comparado a medida basal. ### $p < 0,001$ quando comparado à medida final do grupo maníaco. Dados foram transformados logaritmicamente.

Quando a preferência de sacarose é comparada entre os sexos, foi possível observar diferenças na preferência basal entre os sexos, no qual fêmeas apresentam uma preferência inicial mais alta. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Fator sexo ($F_{1,91} = 36,5$; $p < 0,001$); classificação ($F_{3,91} = 3,3$; $p < 0,03$); interação sexo X classificação ($F_{3,91} = 4,6$; $p < 0,005$) (Figura 15).

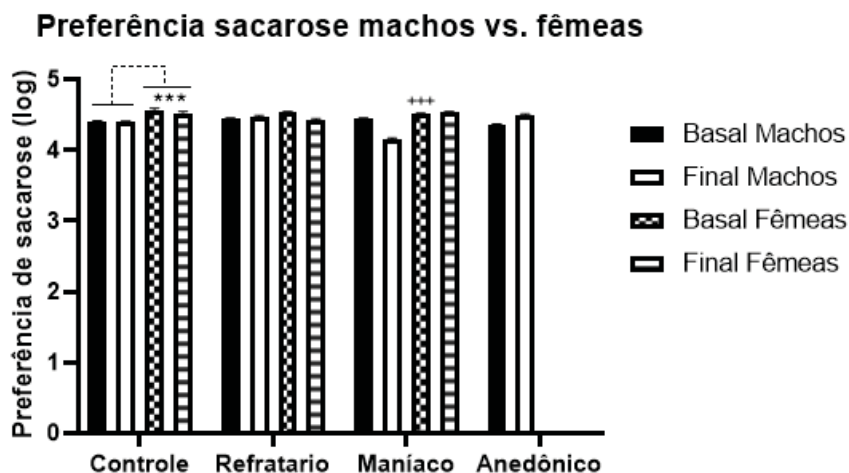


Fig. 15. Preferência de sacarose comparando os gêneros, com nova abordagem de distribuição (anedonia = diminuição de consumo de pelo menos 15% ou consumo abaixo de 65%; refratariedade = ausência de mudança, consumo entre 70 e 80%; mania = consumo superior a 85% ou aumento de

consumo maior que 10%). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparado a medida dos machos controle. +++p<0,001 quando comparado à medida basal do grupos maníaco (machos). Dados foram transformados por logaritmização.

Importante ressaltar que os próximos resultados usam a classificação obtida no teste de preferência de sacarose, avaliando somente as diferenças comportamentais entre cada grupo.

II. Teste do ninho

O teste do ninho mostrou que o grupo anedônico e maníaco apresentaram menor score, ou seja, construíram ninhos menos elaborados. O grupo de machos apresentou diferença significativa entre o grupo maníaco comparado ao controle. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey. Fator classificação ($F_{1,44}=4,63$; $p<0,01$) (Figura 16).

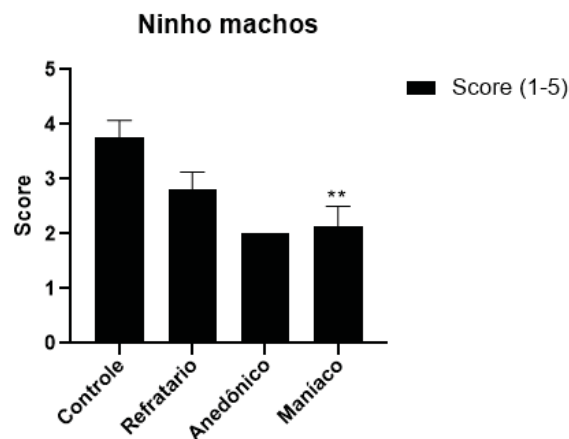


Fig. 16. Teste do ninho em machos após o modelo de ECBRI. Dados representam média±SEM; N=13-17 (controle, refratário, maníaco) / N=2 (anedônicos); **p<0,01 comparado ao grupo controle.

No grupo das fêmeas não houve diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 17).

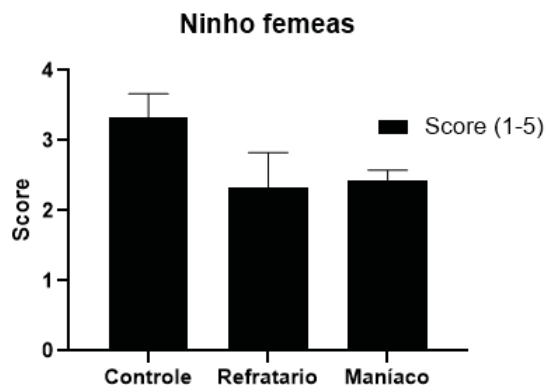


Fig. 17. Teste do ninho em fêmeas após o modelo de ECBRI. Dados representam média±SEM; N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos.

Quando os sexos foram analisados em conjunto, não foi observada diferença no fator sexo. A análise de ambos os grupos, sem contar este fator, demonstrou significância quanto ao fator classificação. ANOVA fatorial seguida de *post-hoc* de Tukey. Fator classificação ($F_{3,94}=7,52$; $p<0,001$) (Figura 18).

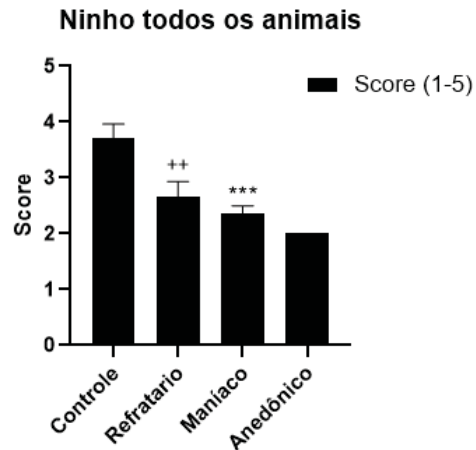


Fig. 18. Teste do ninho em todos os animais, sem fator sexo. N=20 (controle), N=21 (refratário), N=55 (maníaco), N= 2 (anedônicos). Dados representam média±SEM. *** $p<0,001$ e ++ $p<0,01$ comparado ao grupo controle.

III. Análise escala de pelo

Neste teste, os animais tiveram sua pelagem analisada em sete regiões corporais, e uma nota foi atribuída a cada região, sendo o valor máximo, 7 (detalhado no item). Quanto maior a nota, pior o estado da pelagem. Os machos dos grupos refratário, anedônico e maníaco apresentaram aumento significativo na escala de pelo após o ECBRI, quando comparados ao grupo controle. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Fator classificação ($F_{3,44}=32,1$; $p<0,001$); tempo ($F_{1,44}=148,62$; $p<0,001$); interação tempo X classificação ($F_{3,44}=31,67$; $p<0,001$) (Figura 19).

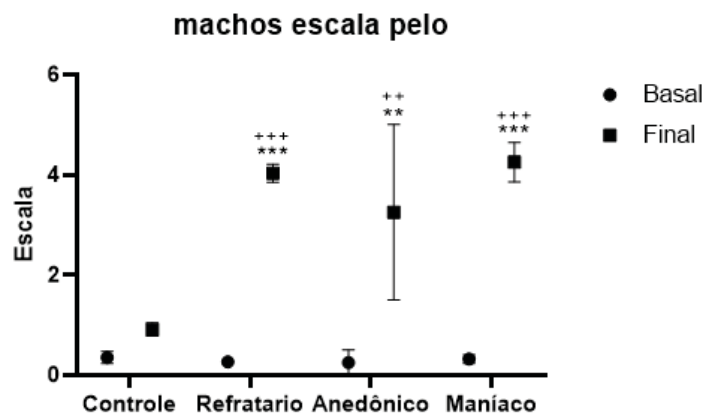


Fig. 19. Escala de pelo em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos); Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos. Dados representam média±SEM; **p<0,01 e ***p<0,001 comparado à medida final; ++p<0,01 e +++p<0,001 comparado ao controle medida final.

As fêmeas do grupo refratário apresentaram escala de pelo mais alta, sendo significativa tanto ao grupo controle quanto ao grupo maníaco. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Fator classificação ($F_{2,47} = 3,49$; $p < 0,05$); tempo ($F_{1,47} = 18,01$; $p < 0,001$) (Figura 20).

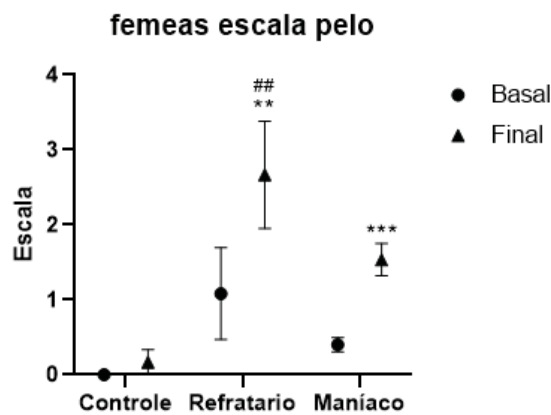


Fig. 20. Escala de pelo em fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Dados representam média±SEM; **p<0,03 comparado controle final; ***p<0,001 comparado à medida basal; ## comparado à medida basal.

Quanto à diferença sexual, o grupo maníaco final dos machos foi significativo em relação ao grupo maníaco final das fêmeas. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Fator sexo ($F_{2,90} = 15,53$; $p < 0,001$); classificação ($F_{6,80} = 6,34$; $p < 0,001$); tempo ($F_{6,80} = 3,84$; $p < 0,001$) (Figura 21).

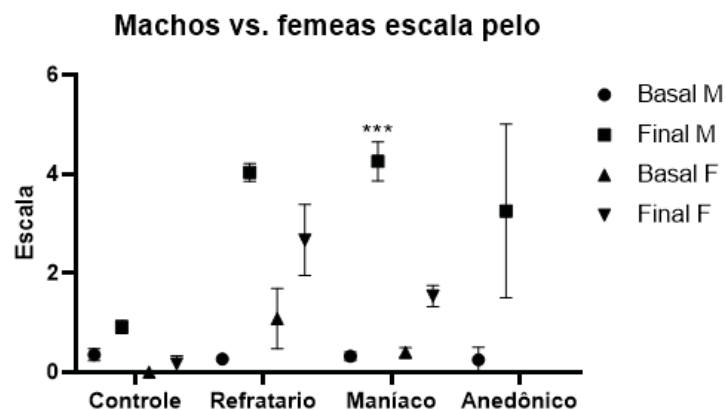


Fig 21. Escala de pelo em machos e fêmeas. Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos). Dados representam média ± SEM. ***p<0,001 comparado ao grupo basal machos.

IV. Teste de natação forçada

Após todos os testes comportamentais, os animais foram submetidos ao teste de natação forçada (TNF) por 5 minutos. Foram quantificados tempo de imobilidade (demonstrado em segundos) e número de escaladas. Quanto ao tempo de imobilidade (T imob, em segundos), não houve diferença significativa entre os grupos, assim como não foi observada diferenças significativas entre os sexos, apesar de que uma tendência foi observada. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 22).

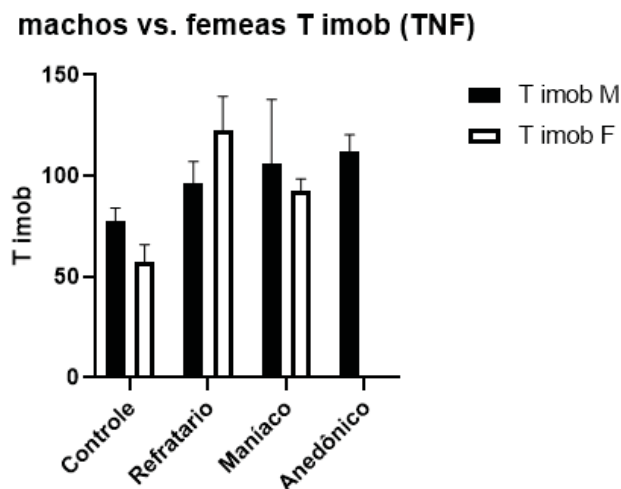


Fig. 22. Tempo de imobilidade (T imob) no TNF em machos e fêmeas. (M) Fêmeas (F) - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos). Dados representam média±SEM.

No número de escaladas, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos e entre os sexos. ANOVA seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 23).

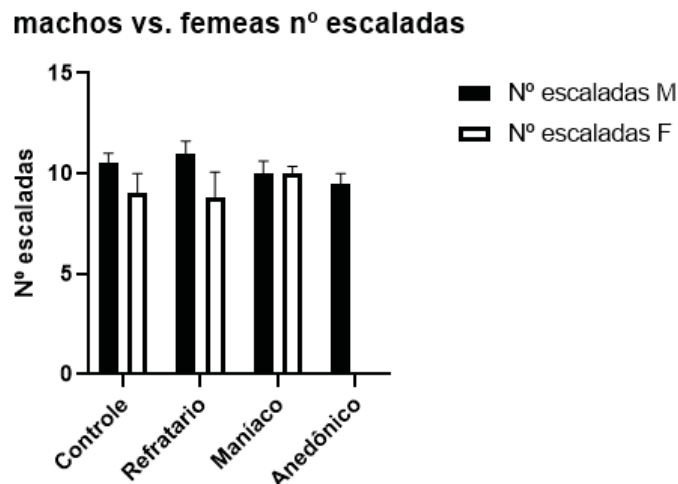


Fig. 23. Nº de escaladas no TNF em machos e fêmeas. Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos). Dados representam média±SEM.

Devido à falta de diferença entre os sexos, os dados de machos e fêmeas foram analisados em conjunto. Ambos os parâmetros não diferiram significativamente entre os grupos. No entanto, houve uma tendência à diferença significativa entre o grupo controle e refratário ($p=0,056$). ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 24).

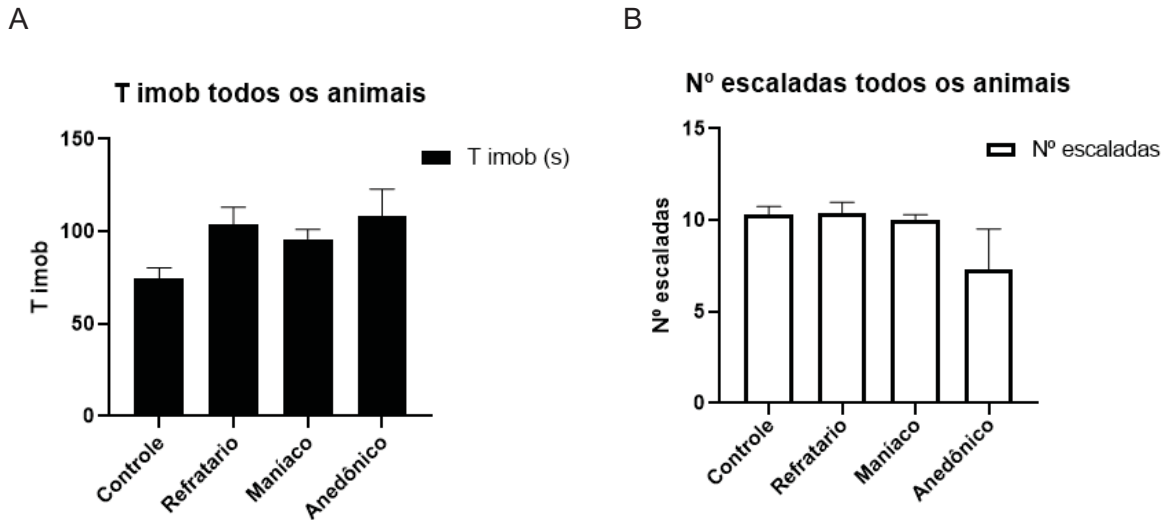


Fig. 24. T imob (A) e N° de escaladas (B) no TNF de camundongos Swiss machos e fêmeas. N=20 (controle), N=21 (refratário), N=55 (maníaco), N=2 (anedônico). Dados representam média±SEM.

V. Caixa de locomoção espontânea

A caixa de locomoção espontânea foi aplicada principalmente para analisar a atividade locomotora dos animais, pois a alteração da mesma pode influenciar diretamente o resultado de outros testes comportamentais, como no TNF e LCE. Quando analisamos todos os fatores (tempo e classificação) *versus* fator sexo, não encontramos diferenças significativas. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey, mostrou significância apenas entre macho controle (Habituação final) vs. fêmea mania (teste basal), e por serem de classificações diferentes, não é uma comparação que confirma uma diferença sexual na locomoção. Quando os animais foram analisados sem considerar o fator sexo, uma diferença significativa foi observada quanto à interação entre os fatores tempo X classificação ($F_{9,282}=3,57$; $p<0,001$) (Figura 25).

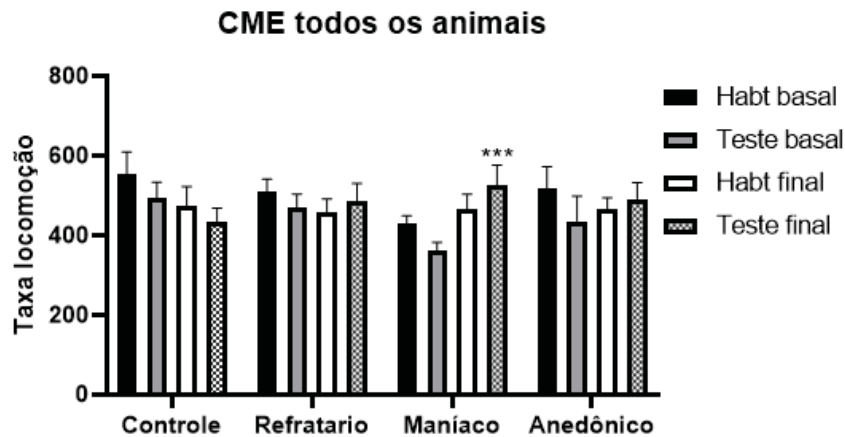


Fig. 25. Locomoção sem analisar o fator sexo, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=20 (controle), N=21 (refratário), N=55 (maníaco), N=2 (anedônico). Dados representam média±SEM. *** $p < 0,001$ quando comparado à medida teste basal do grupo maníaco.

Quando os sexos foram analisados separadamente, ANOVA de medidas repetidas não demonstrou nenhum fator significativo. Por seu um estudo de caráter exploratório, o *post-hoc* de Tukey foi aplicado para verificar se havia uma possível tendência de significância entre as medidas vs. classificação. O grupo maníaco das fêmeas parece ter uma taxa de locomoção mais alta, no entanto um n maior seria necessário para verificar se existe tal diferença de fato (Figura 26).

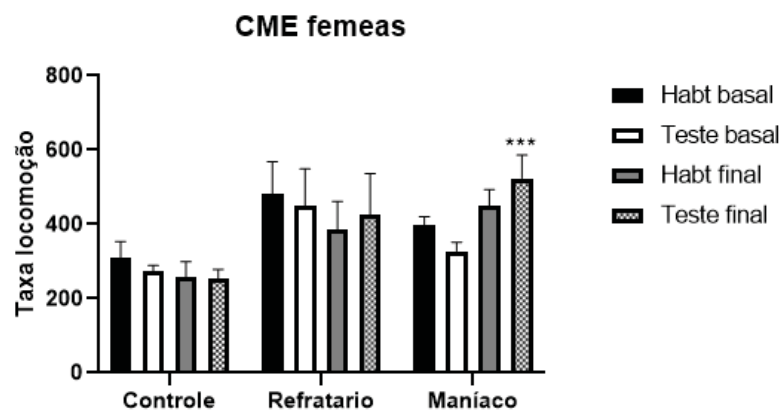


Fig. 26. Locomoção em fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Dados representam média±SEM; *** $p < 0,001$ comparado à medida teste basal.

A análise separada dos machos demonstrou uma diferença significativa entre a primeira exposição ao CME (Habt basal) e a última exposição ao CME (Teste final). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey. Nenhum fator foi significativo (Figura 27).

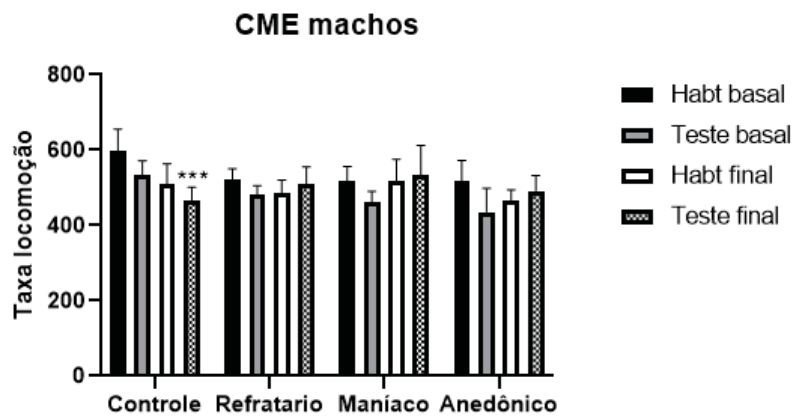


Fig. 27. Locomoção em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos); Dados representam média±SEM; **p<0,01 comparado à medida habt basal.

VI. Teste de esconder esferas (marble-burying)

Este teste consiste em quantificar a o número de esferas enterradas pelo animal, em ao menos 2/3 de cobertura. Após o modelo do ECBRI e da habituação à CME, os animais foram submetidos ao teste por 20 minutos. Quando os grupos macho e fêmea foram analisados separadamente, não foi observada nenhuma diferença estatística, Quando analisados em relação a diferença sexual, ANOVA de duas vias demonstrou significância no fator sexo ($F_{1,90} = 10,76$; $p < 0,01$) (Figura 28).

machos vs. femeas marble-burying

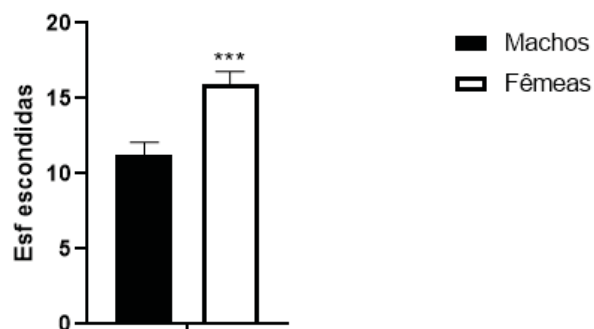


Fig. 28. Teste de Esconder Esferas: nº de esferas escondidas (Esf esc) em machos e fêmeas. Machos - N=48, Fêmeas - N=51. Dados representam média±SEM. ***p<0,05 comparado aos machos.

VII. Labirinto em cruz elevado (LCE)

Analisados separadamente, machos e fêmeas não apresentaram diferença significativa nos parâmetros, mas quando o fator sexo foi incluído na análise, observou-se diferenças significativas apenas na % de tempo nos BA. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey. Fator sexo ($F_{2,90} = 9,91$; $p < 0,001$) (Figura 29 e 30).

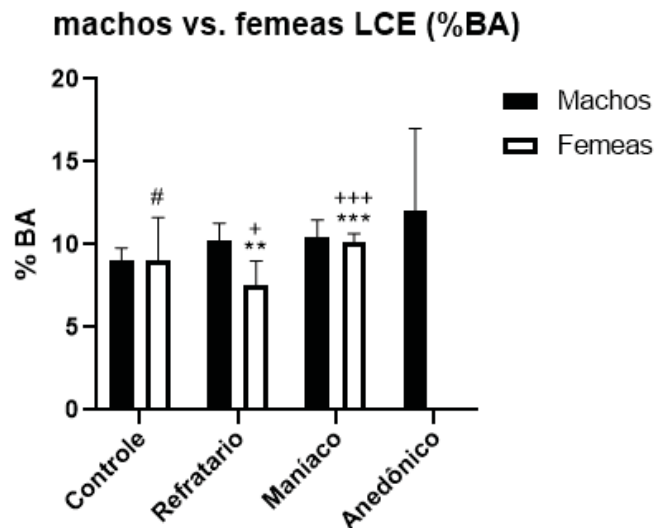


Fig. 29. Labirinto em Cruz Elevado (LCE): % de entradas nos Braços Abertos (BA) de camundongos machos e fêmeas após o modelo de ECBRI. Dados representam média \pm SEM; Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco) / N=2 (anedônicos). ** $p < 0,01$ comparado aos machos grupo refratário; *** $p < 0,001$ comparado aos machos grupo maníaco; + $p < 0,03$ comparado aos machos grupo controle; +++ $p < 0,001$ comparado aos machos grupo refratário; # $p < 0,03$ comparado aos machos grupo refratário.

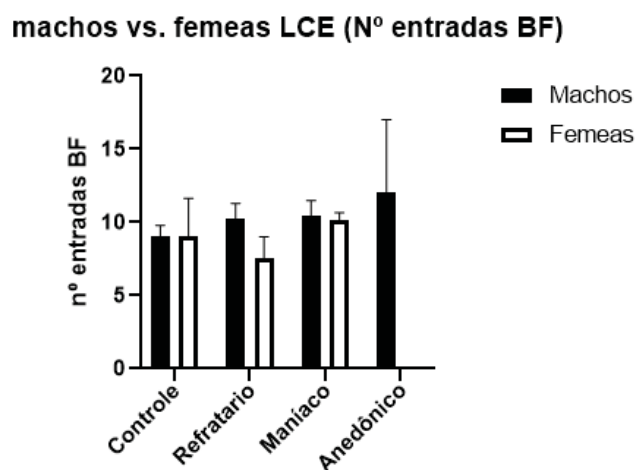


Fig. 30. Labirinto em Cruz Elevado (LCE): N° de entradas nos Braços Fechados (BF) no teste do LCE em machos e fêmeas após o modelo de ECBRI. Dados representam média \pm SEM; Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco) / N=2 (anedônicos).

VIII. Análise do peso

Os animais tiveram seu peso quantificado uma vez por semana, no mesmo dia da análise da pelagem. O grupo de machos apresentou diferenças significativas quanto à medida basal. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: interação tempo X classificação ($F_{15,220} = 7,33$; $p < 0,0001$) (Figura 31).

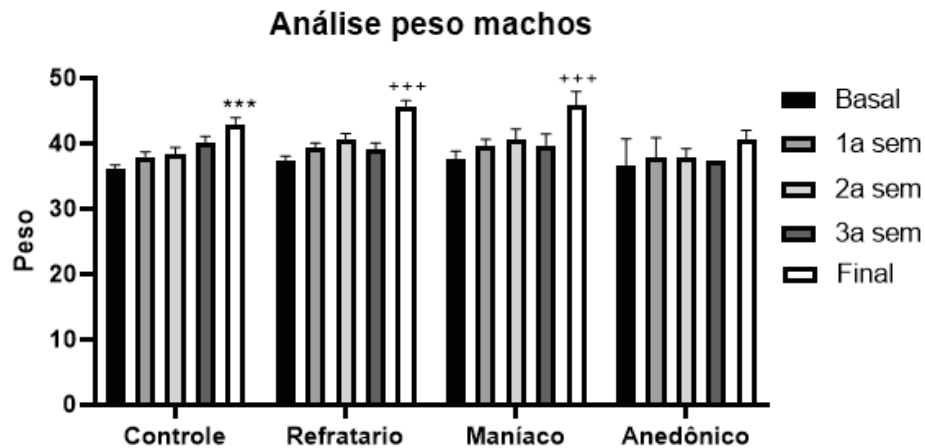


Fig. 31. Análise peso em machos, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI). N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos); Dados representam média±SEM; *** $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ comparado ao grupo controle basal.

O grupo fêmeas também apresentou diferenças significativas entre grupos. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: interação tempo X classificação ($F_{8,188} = 4,67$; $p < 0,0001$) (Figura 32).

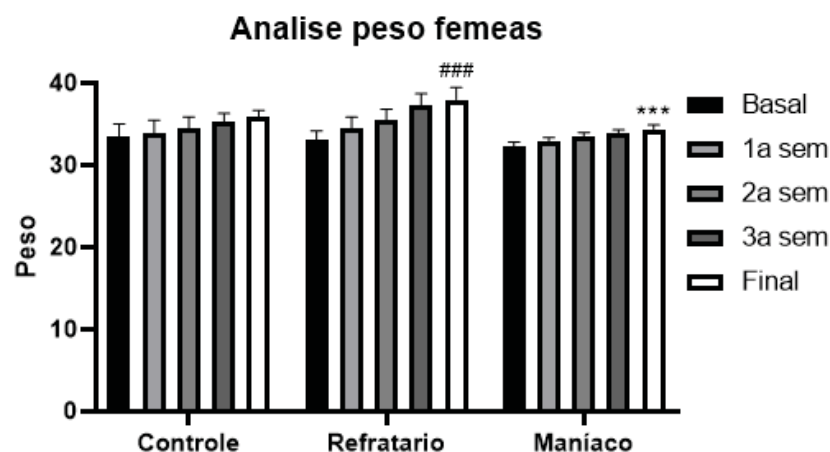


Fig. 32. Análise peso em fêmeas, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI). N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos); Dados representam média±SEM; *** $p < 0,01$ comparado ao grupo maníaco basal; ### $p < 0,0001$ comparado ao grupo refratário final.

O fator sexo também foi significativo, quanto às medidas finais. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator sexo ($F_{1,90} = 20,43$; $p < 0,001$), interação sexo X tempo ($F_{1,90} = 13,72$; $p < 0,001$) (Figura 33).

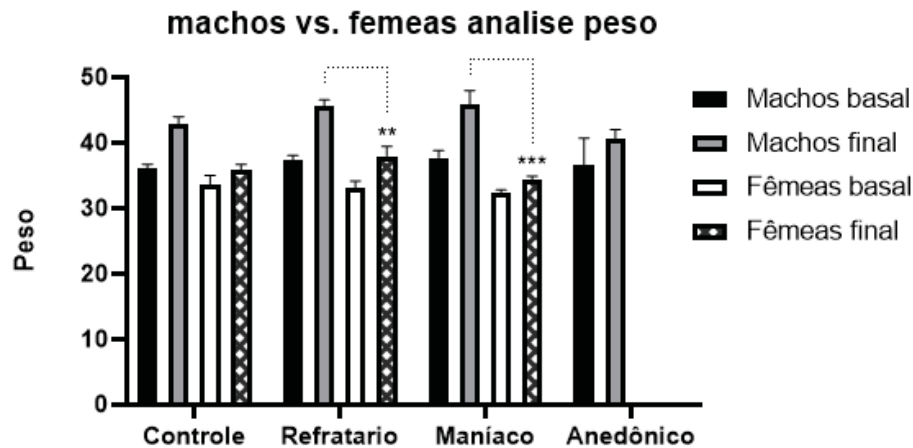


Fig. 33. Análise peso em machos e fêmeas após o modelo de ECBRI. Dados representam média \pm SEM; Fêmeas - N=3 (controle), N=6 (refratário), N=41 (maníaco), sem anedônicos; Machos - N=13-17 (controle, refratário, maníaco)/ N=2 (anedônicos). ** $p < 0,03$ comparado ao refratário final (machos); *** $p < 0,001$ comparado ao maníaco final (machos).

4.2.2. Modelo de hipertireoidismo em animais submetidos ao ECBRI

Nesta fase, camundongos Swiss machos e fêmeas foram submetidos ao modelo de indução de hipertireoidismo (como detalhado no item 3.4.3), três semanas antes do início do ECBRI. Devido ao maior número de fatores, os gráficos da interação dos fatores significativos (quando observados) serão apresentados separadamente, para melhor visualização das diferenças estatísticas obtidas.

I. Preferência de sacarose

Nesta bateria, observa-se que os animais, tanto machos quanto fêmeas se enquadram em maioria na classificação do grupo anedonia.

A distribuição no grupo dos machos foi n=5 (controle), n=12 (refratário), n=7 (maníaco) e n=27 (anedonia). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey demonstrou diferenças significativas na interação entre os fatores tempo X classificação ($F_{3,43} = 19,55$; $p < 0,0001$) (Figura 34).

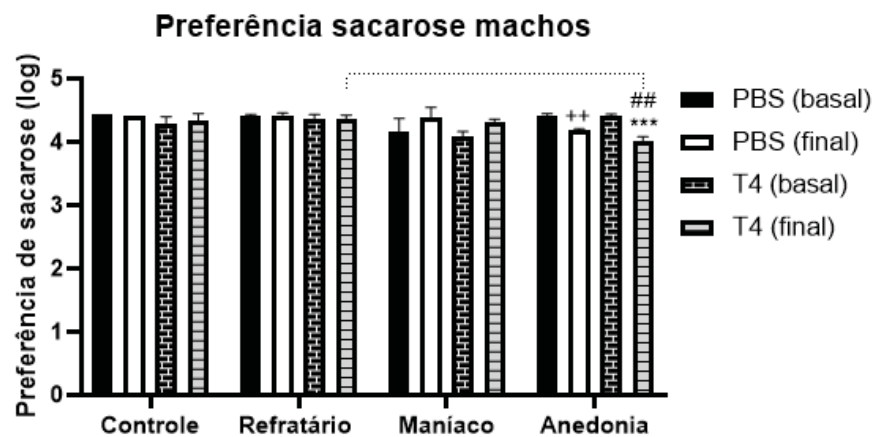


Fig 34. Preferência de sacarose de camundongos Swiss machos submetidos ao ECBRI. No gráfico, são demonstradas a medida basal (antes do ECBRI) e a medida final (após o ECBRI) de cada grupo. Grupo PBS (eutireóide) - N=1 (controle), N=6 (refratário), N=2 (maníaco), N=12 (anedônicos); Grupo T4 (hipertireoidismo) - N=4 (controle), N=6 (refratário), N=5 (maníaco), N=15 (anedônicos). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparado ao basal do grupo anedonia (T4); ##p<0,03 comparado ao final do grupo refratário (T4); ++p<0,01 comparado ao basal do grupo anedonia (PBS). Dados foram transformados por logaritmização.

As fêmeas tiveram distribuição entre os grupos semelhante aos machos: n=10 (controle), n=11 (refratário), n=6 (maníaco) e n=27 (anedonia). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey demonstrou diferenças significativas quanto ao fator classificação ($F_{3,46} = 5,06$; $p < 0,01$), assim como na interação entre os fatores tempo X classificação ($F_{3,46} = 44,56$; $p < 0,0001$). Apesar das fêmeas classificadas como grupo maníaco não apresentarem consumo basal elevado (>85%), seu aumento no consumo ao longo do ECBRI foi relevante (acima de 15%), ao mesmo tempo que é observada uma diminuição significativa no consumo dos grupos anedônicos, independente do tratamento (Figura 35).

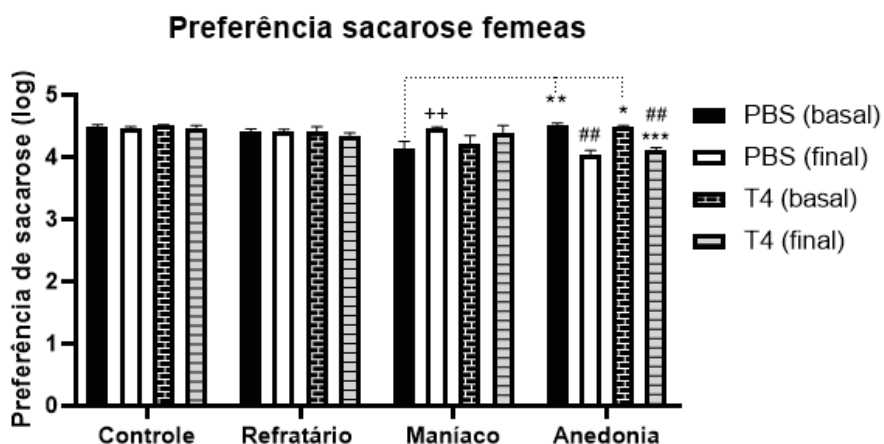


Fig. 35. Preferência de sacarose de camundongos Swiss fêmeas submetidas ao ECBRI. No gráfico, são demonstradas a medida basal (antes do ECBRI) e a medida final (após o ECBRI) de cada grupo. Grupo PBS (eutireóide) - N=5 (controle), N=3 (refratário), N=3 (maníaco), N=14 (anedônicos); Grupo T4 (hipertireoidismo) - N=5 (controle), N=8 (refratário), N=3 (maníaco), N=13 (anedônicos). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparado ao basal do grupo anedonia (T4); *p<0,05, **p<0,01 e ++p<0,01 comparados ao basal do grupo maníaco (PBS); ##p<0,01

comparado ao final dos grupos controle (PBS/ T4). Dados foram transformados por logaritmização.

ANOVA de três vias seguida de *post-hoc* de Tukey revelou que o fator sexo não foi significativo. Assim, apenas o modelo de ECBRI foi capaz de modificar o consumo de sacarose dos animais, de modo que quando estes foram analisados em conjunto, a significância para o fator classificação ($F_{3,97} = 7,87$; $p < 0,0001$) e tempo X classificação ($F_{3,97} = 57,79$; $p < 0,0001$) permanece.

II. Teste do ninho

Não foi observada nenhuma diferença significativa quando o grupo dos machos e das fêmeas foram analisados individualmente. No entanto, quando o fator sexo foi adicionado à análise, foram observadas diferenças significativas. ANOVA de três vias indicou um efeito significativo na interação entre fatores sexo X classificação ($F_{3,89} = 2,92$; $p < 0,04$), mas o teste *post-hoc* de Tukey não indicou diferença entre os grupos (Figura 36).

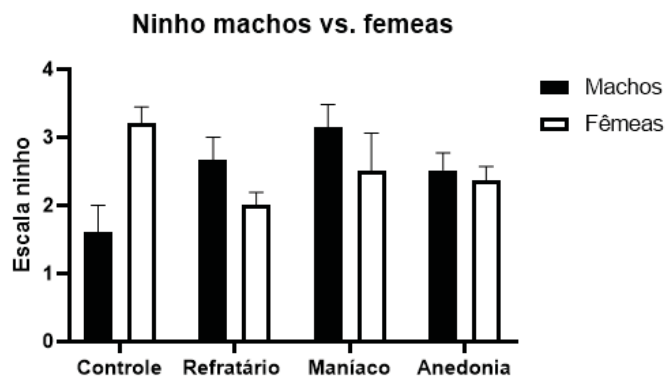


Fig. 36. Teste do ninho de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos ao ECBRI. Machos - N=5 (controle); N=12 (refratário); N=7 (maníaco); N=27 (anedonia). Fêmeas - N=10 (controle); N=11 (refratário); N=6 (maníaco); N=27 (anedonia). Dados representam média±SEM.

III. Análise escala de pelo

Neste teste, o grupo dos machos apresentou significância na interação entre os fatores tempo e tratamento. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey. Interação entre fatores tempo X tratamento ($F_{1,43} = 5,16$; $p < 0,03$) (Figura 37).

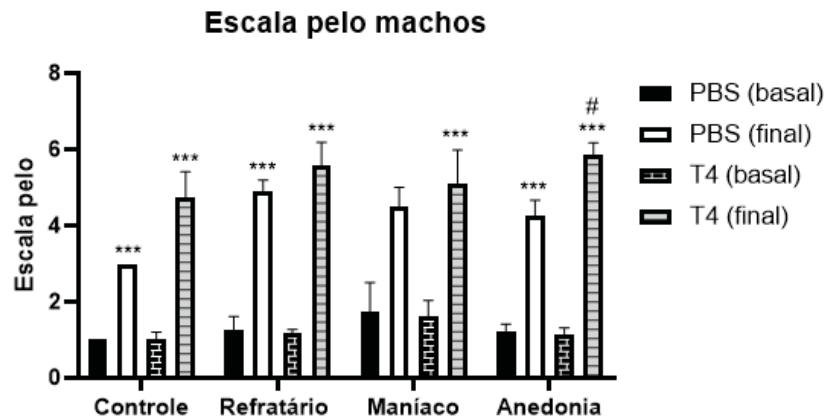


Fig. 37. Escala de pelo em machos, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Grupo PBS (eutireóide) - N=1 (controle), N=6 (refratário), N=2 (maníaco), N=12 (anedônicos); Grupo T4 (hipertireoidismo) - N=4 (controle), N=6 (refratário), N=5 (maníaco), N=15 (anedônicos). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparado à medida basal do mesmo grupo e tratamento; #p<0,03 comparado à medida final do grupo anedonia (PBS).

Quanto às fêmeas, estas apresentaram significância nos fatores classificação ($F_{3,46} = 5,78$; $p < 0,01$) e na interação entre o tempo X classificação ($F_{3,46} = 4,19$; $p < 0,03$). O fator tratamento apresentou uma tendência à significância ($p = 0,084$). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 38).

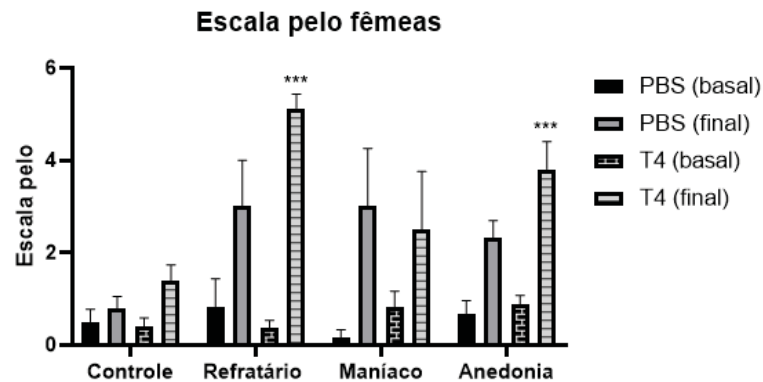


Fig. 38. Escala de pelo em camundongos Swiss fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Grupo PBS (eutireóide) - N=5 (controle), N=3 (refratário), N=3 (maníaco), N=14 (anedônicos); Grupo T4 (hipertireoidismo) - N=5 (controle), N=8 (refratário), N=3 (maníaco), N=13 (anedônicos). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparado à medida basal (T4).

Quando o fator sexo foi adicionado à análise, foram observadas diversas diferenças significativas, no entanto não houve interação entre os três fatores (sexo, classificação e tratamento). Mesmo assim, pode-se observar que os machos adquiriram uma piora mais elevada no estado geral da pelagem. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Fator sexo ($F_{1,89} = 38,95$; $p < 0,0001$), classificação ($F_{3,89} = 4,32$; $p < 0,01$), tratamento

($F_{1,89} = 5,9$; $p < 0,03$), tempo X sexo ($F_{1,89} = 10,89$; $p < 0,01$), tempo X classificação ($F_{3,89} = 3,67$; $p < 0,03$), tempo X tratamento ($F_{1,89} = 6,77$; $p < 0,03$) (Figura 39).

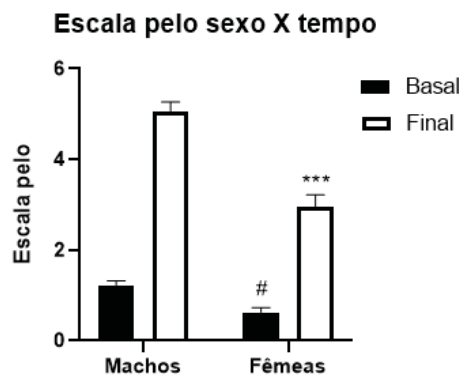
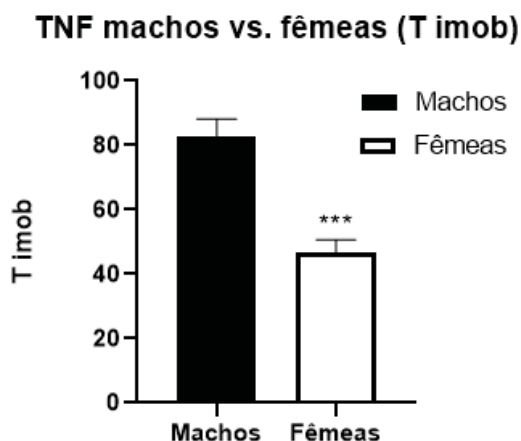


Fig. 39. Escala de pelo em camundongos Swiss machos e fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=51 (machos); N=54 (fêmeas). Dados representam média±SEM; fator tempo X sexo. *** $p < 0,0001$ comparado à medida final (machos); # $p < 0,05$ comparado à medida basal (machos).

IV. Teste de natação forçada

Neste teste, tanto machos quanto fêmeas não apresentaram diferenças significativas quanto aos parâmetros analisados, tais como tempo de imobilidade e escalada. No entanto, o fator sexo foi significativo nos dois parâmetros. ANOVA fatorial seguida de *post-hoc* de Tukey: N° de escaladas, fator sexo ($F_{1,89} = 9,25$; $p < 0,01$); Tempo de imobilidade ($F_{1,89} = 9,68$; $p < 0,01$) (Figura 40).

A



B

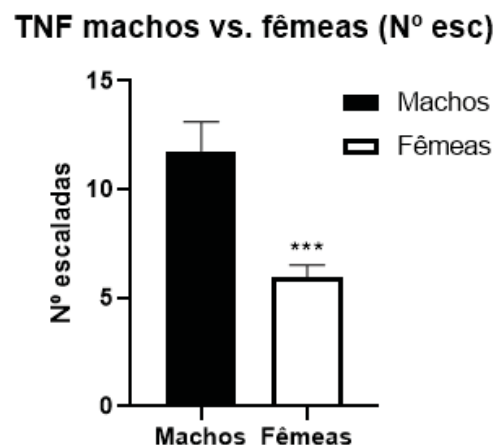


Fig. 40. T imob (A) e N° de escaladas (B) no Teste de Natação Forçada (TNF) em machos e fêmeas ao final do ECBRI. Fêmeas - N=54; Machos - N=51. Dados representam média±SEM. *** $p < 0,001$ comparado aos machos.

V. Caixa de locomoção espontânea

A análise individual pelo sexo demonstrou que apenas o grupo das fêmeas obteve diferenças significativas. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ($F_{1,46} = 4,73$; $p < 0,04$). Apesar destes dados, o teste de Tukey não demonstrou significância entre os grupos, mas uma tendência ($p = 0,08$), como pode ser observado no gráfico: o grupo tratado com T4 parece ter a taxa de locomoção mais alta, em todas as exposições (Figura 41).

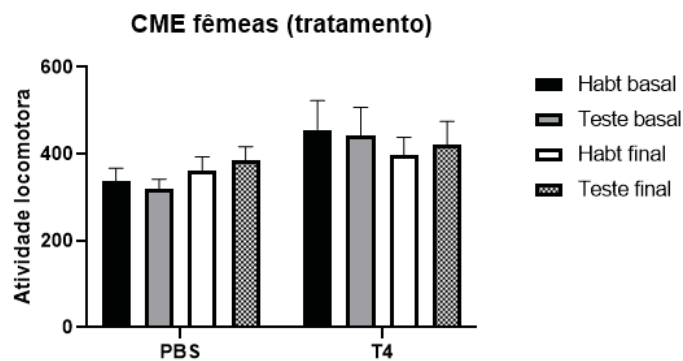


Fig. 41. Locomoção (número de interrupções) de camundongos Swiss fêmeas, antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=25 (PBS), N=29 (T4); Dados representam média±SEM.

Quando analisados adicionando o fator sexo, uma tendência de significância foi observada em relação à interação dos fatores sexo X tratamento ($F_{1,89} = 2,96$; $p = 0,08$). ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 42).

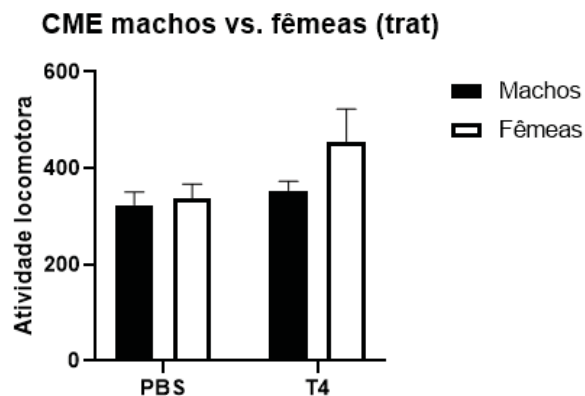


Fig. 42. Locomoção em camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com veículo (PBS) ou T4 submetidos modelo de ECBRI. Machos - N=21 (PBS), N=30 (T4); Fêmeas - N=25 (PBS), N=29 (T4). Dados representam média±SEM.

A significância apenas foi observada com a análise de ambos grupos, sem incluir o fator sexo (uma vez que não houve diferença estatística quanto a este fator). ANOVA de medidas

repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ($F_{1,97} = 4,90$; $p < 0,03$), mas o teste de Tukey não mostrou significância entre os pares (Figura 43).

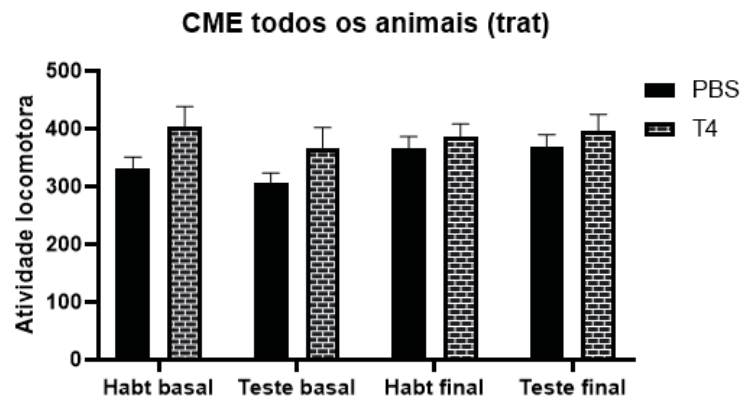


Fig. 43. Locomoção de camundongos Swiss fêmeas e machos tratados com veículo (PBS) ou T4 antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. N=46 (PBS), N=59 (T4). Dados representam média±SEM.

VI. Teste de esconder esferas (marble-burying)

Neste modelo de ansiedade, observou-se diferença estatística apenas quando o sexo foi levado em conta. ANOVA fatorial seguida de *post-hoc* de Tukey: fator sexo ($F_{1,89} = 6,67$; $p < 0,03$) (Figura 44).

Marble-burying machos vs. fêmeas

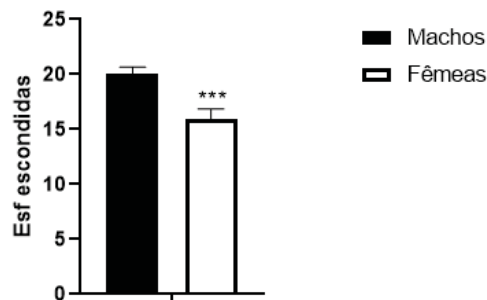


Fig. 44. Teste de Marble-burying: N° de esferas escondidas por camundongos Swiss machos e fêmeas. Machos - N=51; Fêmeas - N=54. Dados representam média±SEM. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo machos.

VII. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Tal como o teste anterior, a significância entre alguns fatores foi observada na % de tempo nos BA somente quando os animais foram analisados na totalidade, sem incluir o fator sexo. Porém, a interação entre os fatores sexo vs. tratamento quase foi significativa ($F_{1,89} = 3,85$; $p = 0,052$). ANOVA fatorial seguida de *post-hoc* de Tukey: fator classificação ($F_{3,89} = 2,89$; $p < 0,04$) (Figura 45).

% tempo BA-todos os animais (classif)

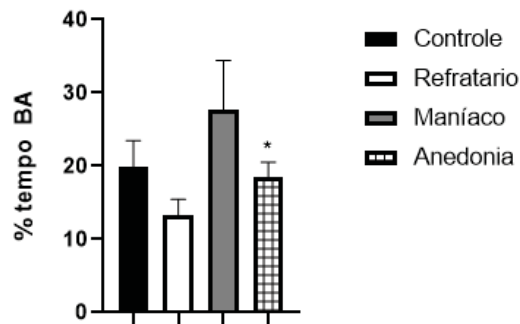


Fig. 45. Labirinto em Cruz Elevado: % de tempo nos braços abertos (BA) de camundongos Swiss (machos e fêmeas) conforme a classificação pela preferência de sacarose. N=15 (controle), N=23 (refratário); N=13 (maníaco); N=54 (anedonia). Dados representam média±SEM. * $p < 0,001$ comparado ao grupo refratário.

VIII. Análise do peso

O grupo dos machos apresentou diferenças significativas quanto ao tratamento, de modo que o grupo tratado com T4 apresentou variação maior no peso. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ($F_{1,43} = 8,39$; $p < 0,01$); tempo X tratamento ($F_{4,172} = 5,12$; $p < 0,001$) (Figura 46).

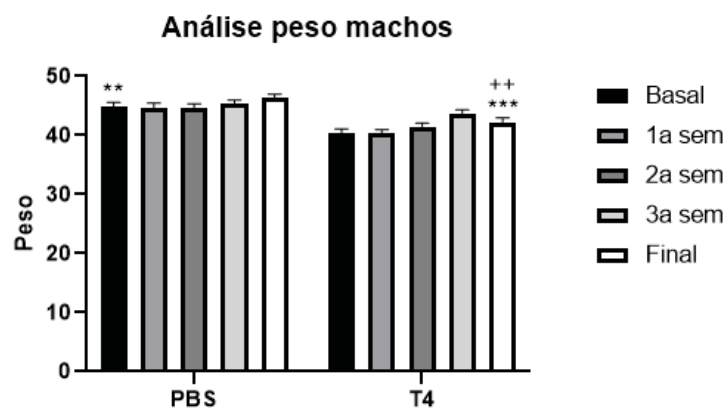


Fig. 46. Análise semanal de peso (em gramas) em camundongos Swiss machos submetidos ao modelo de ECBRI tratados com veículo (PBS) ou T4. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI). N=21 (PBS), N=30 (T4). Dados representam média±SEM; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao grupo T4 basal; ++ $p < 0,01$ comparado ao grupo PBS basal

As fêmeas tratadas com T4 também apresentaram maior variação de peso ao longo do tempo. No entanto, os dados demonstram maior ganho de peso nas fêmeas quando compara-se o valor basal e o valor final. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tempo X tratamento ($F_{4,184} = 15,25$; $p < 0,0001$); tempo X tratamento X classificação ($F_{12,184} = 2,19$; $p < 0,03$) (Figura 47 e 48).

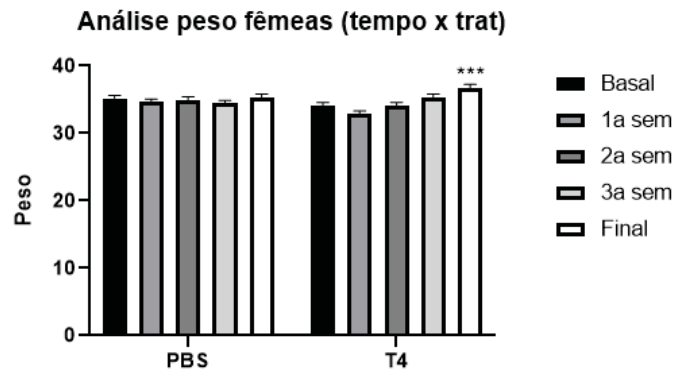


Fig. 47. Análise peso (em gramas) em fêmeas, uma medida por semana. Basal (antes do ECBRI) e Final (após o ECBRI). N=25 (PBS), N=29 (T4). Dados representam média±SEM; ***p<0,01 comparado às medidas restantes do grupo T4.

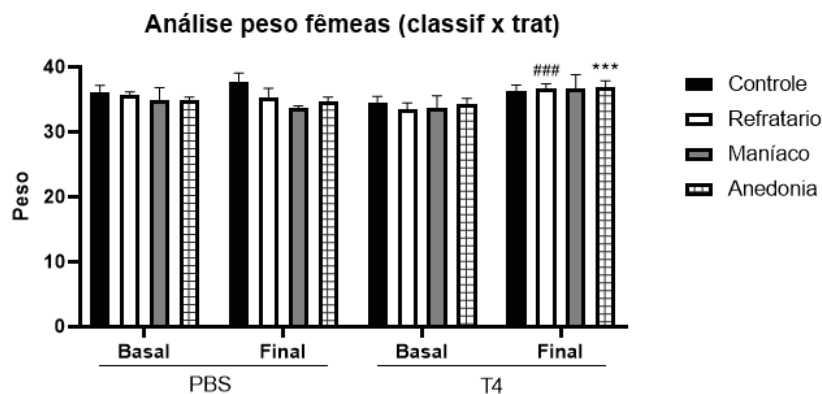


Fig. 48. Análise peso (em gramas) de camundongos Swiss fêmeas tratadas com veículo (PBS) ou T4 submetidas ao ECBRI), basal (antes do ECBRI) e final (após o ECBRI). N=25 (PBS), N=29 (T4). Dados representam média±SEM; ***p<0,0001 comparado à medida basal do grupo T4; ###p<0,001 comparado à medida basal do grupo refratário.

Quando o fator sexo foi incluído na análise por ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey, foram observadas diferenças significativas nos seguintes fatores: tratamento ($F_{1,89} = 8,62$; $p < 0,01$); sexo ($F_{1,89} = 116,26$; $p < 0,0001$); interação sexo X tratamento ($F_{1,89} = 8,25$; $p < 0,01$); tempo X tratamento ($F_{1,89} = 9,55$; $p < 0,01$) (Figura 49).

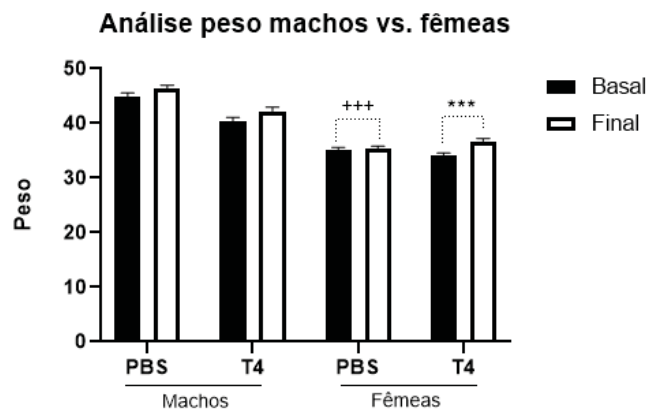


Fig. 49. Análise peso (em gramas) de camundomngos Swiss machos e fêmeas tratados com veículo

(PBS) ou T4 submetidos ao ECBRI). Basal (antes do ECBRI) e final (após o ECBRI). Machos - N=21 (PBS), N=30 (T4); Fêmeas - N=25 (PBS), N=29 (T4). Dados representam média±SEM; ***p<0,0001 comparado às medidas basal e final do grupo T4 (machos); +++p<0,001 comparado às medidas basal e final do grupo PBS (machos).

4.2.3. Modelo de hipotireoidismo em animais submetidos ao ECBRI

Camundongos Swiss machos e fêmeas foram submetidos ao modelo de indução de hipotireoidismo (como detalhado no item 3.4.3), três semanas antes do início do ECBRI. Devido ao maior número de fatores, os gráficos da interação dos fatores significativos (quando observados) serão apresentados separadamente, para melhor visualização das diferenças estatísticas obtidas.

I. Preferência de sacarose

O grupo dos machos apresentou diferenças significativas quanto à classificação por ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: Interação fator tempo X classificação ($F_{3,45} = 17,36$; $p < 0,0001$). Fator tratamento apresentou tendência à ser significativo ($F_{1,45} = 3,53$; $p = 0,06$). Para este grupo, foram utilizados dados transformados por raiz quadrada para enquadrar os dados na distribuição normal de Kolgomorov-Smirnov, possibilitando análises paramétricas (Figura 50).

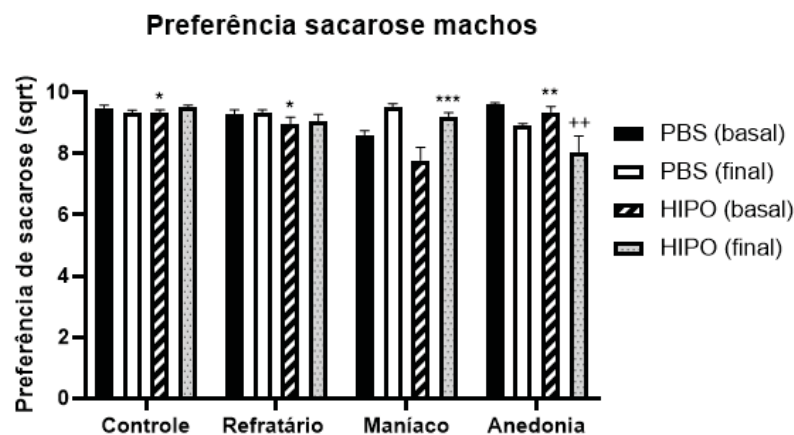


Fig. 50. Preferência de sacarose em camundongos Swiss machos eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI. Medida basal (antes do ECBRI) e a medida final (após o ECBRI) de cada grupo. Grupo PBS (eutireóide) - N=8 (controle), N=8 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=4 (controle), N=9 (refratário), N=12 (maníaco), N=5 (anedônicos). Dados representam média±SEM; *p<0,03, **p<0,01 e ***p<0,001 comparados ao grupo maníaco basal (HIPO); ++p<0,01 comparado ao grupo anedonia basal (HIPO). Dados foram transformados por raiz quadrada.

Quanto ao grupo fêmeas, foram observadas diferenças quanto à classificação. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator classificação ($F_{3,44} = 44,10$;

$p < 0,0001$); interação tratamento X classificação ($F_{3,44} = 4,11$; $p < 0,03$); tempo X classificação ($F_{3,44} = 41,60$; $p < 0,0001$) (Figura 51).

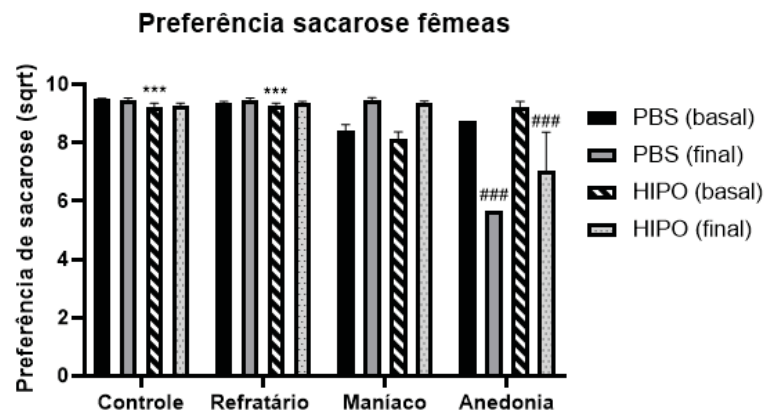


Fig. 51. Preferência de sacarose em camundongos Swiss fêmeas eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI. Medida basal (antes do ECBRI) e a medida final (após o ECBRI) de cada grupo. Grupo PBS (eutireóide) - N=6 (controle), N=11 (refratário), N=8 (maníaco), N=1 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=7 (controle), N=12 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos). Dados representam média±SEM; *** $p < 0,001$ comparados ao grupo mania basal (HIPO); ### $p < 0,001$ comparado ao grupo anedonia basal. Dados foram transformados por raiz quadrada.

O fator sexo também foi significativo, de modo que a ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey mostrou diversos efeitos: fator sexo ($F_{1,89} = 5,76$; $p < 0,03$); sexo X tratamento ($F_{1,89} = 4,05$; $p < 0,05$); sexo X classificação ($F_{3,89} = 5,52$; $p < 0,01$); sexo X tempo ($F_{1,89} = 8,44$; $p < 0,01$); sexo X classificação X tempo ($F_{3,89} = 4,26$; $p < 0,01$). Após análise pelo teste de Tukey, as diferenças significativas reais são em relação à classificação vs. sexo (gráfico X). As fêmeas do grupo anedonia exibiram menor consumo de sacarose (Figura 52).

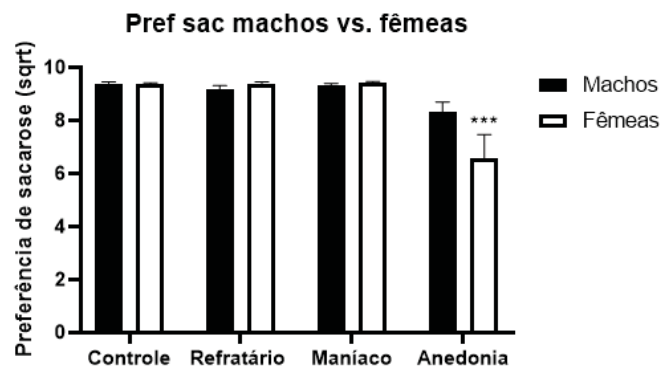


Fig. 52. Preferência de sacarose (em raiz quadrada) de camundongos Swiss machos e fêmeas conforme a classificação em resposta ao ECBRI (Medida final, após ECBRI). Machos - N=12 (controle), N=17 (refratário), N=17 (maníaco), N=7 (anedônicos); Fêmeas - N=13 (controle), N=23 (refratário), N=13 (maníaco), N=3 (anedônicos). Dados representam média±SEM; *** $p < 0,001$ comparados ao grupo anedonia machos. Dados foram transformados por raiz quadrada.

II. Teste do ninho

Quando os sexos foram analisados separadamente, apenas as fêmeas apresentaram diferenças significativas. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator classificação ($F_{3,44} = 3,04$; $p < 0,04$) (Figura 53).

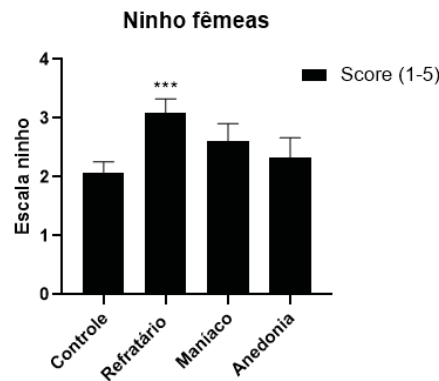


Fig. 53. Teste do ninho de camundongos Swiss fêmeas classificadas pela resposta ao ECBRI (classificação pela preferência de sacarose). N=13 (controle), N=23 (refratário), N=13 (maníaco), N=3 (anedônicos). Dados representam média±SEM; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

O fator sexo não foi significativo, e a análise de todos os animais também resultou na diferença significativa no fator classificação ($F_{3,97} = 4,09$; $p < 0,01$), entre os grupos controle e refratário (dados dos machos e dados agrupados não apresentados).

III. Análise escala de pelo

Os resultados demonstram que o estado geral da pelagem nos machos foi influenciado pela classificação. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator classificação ($F_{3,45} = 6,18$; $p < 0,04$). O fator tratamento apresentou tendência a ser significativo, de modo que ($F_{1,45} = 3,36$; $p = 0,07$). Uma análise exploratória com *post-hoc* de Tukey para tratamento X tempo sugere diferenças entre grupo PBS e HIPO ($p < 0,01$) (Figura 54).

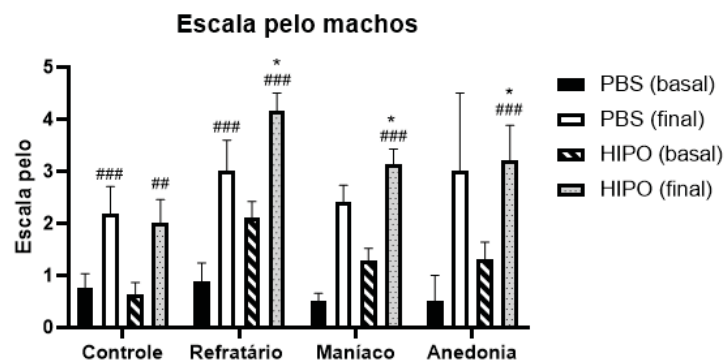


Fig. 54. Escala de pelo de camundongos Swiss machos eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI. Antes (basal) e após (final) o modelo de ECBRI. Grupo PBS (eutireóide) - N=8 (controle), N=8 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos); Grupo HIPO

(hipotireoidismo) - N=4 (controle), N=9 (refratário), N=12 (maníaco), N=5 (anedônicos). Dados representam média±SEM; *p<0,01 comparado ao grupo controle basal (HIPO); ##p<0,01 e ###p<0,001 comparado ao respectivo valor basal.

Quanto às fêmeas, ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey mostrou efeito significativo para fator tratamento ($F_{1,44} = 12,55$; $p < 0,001$) e tempo X tratamento ($F_{1,44} = 6,06$; $p < 0,03$) (Figura 55).

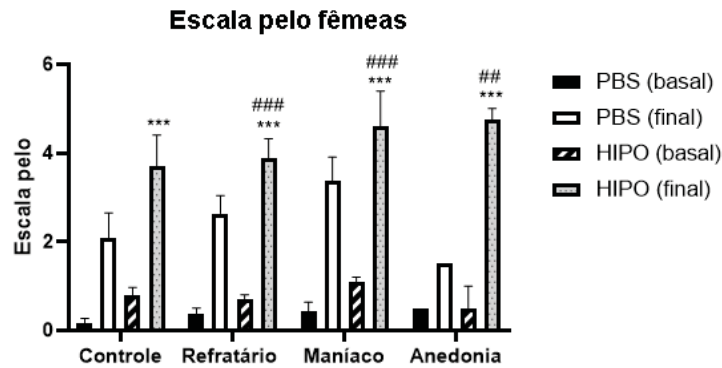


Fig. 55. Escala de pelo de camundongos Swiss fêmeas eutireóides (PBS) ou com hipotireoidismo (HIPO) submetidos ao ECBRI. Antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Grupo PBS (eutireóide) - N=6 (controle), N=11 (refratário), N=8 (maníaco), N=1 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=7 (controle), N=12 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparados às respectivas medidas basais; ##p<0,01 e ###p<0,001 comparados ao controle basal.

O fator sexo também foi significativo, de modo que ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey exibiu significância para interação entre tempo X sexo ($F_{1,89} = 10,82$; $p < 0,01$) e tempo X sexo X tratamento ($F_{1,89} = 7,26$; $p < 0,01$) (Figura 56).

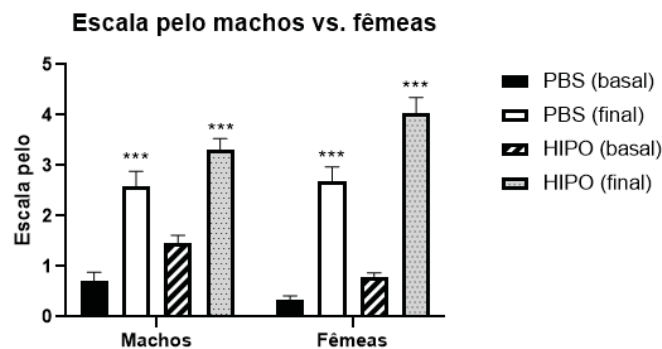


Fig. 56. Escala de pelo de camundongos Swiss machos e fêmeas eutireóides (PBS) e hipotireóides (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI. Antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Machos - N=23 (PBS); N=30 (HIPO). Fêmeas - N=26 (PBS); N=26 (HIPO). Dados representam média±SEM; ***p<0,001 comparados às respectivas medidas basais.

IV. Teste de natação forçada

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados (nº de escaladas e tempo de imobilidade), tanto em machos quanto em fêmeas, tal como não houve diferença entre os sexos. Mesmo com a análise dos grupos macho e fêmea sem o fator sexo, os resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 57).

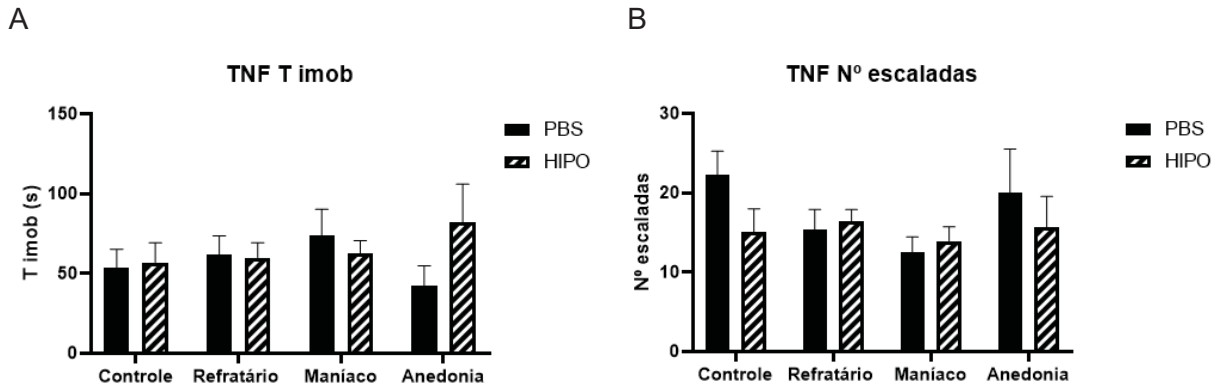


Fig. 57. Tempo de imobilidade - T imob (A) e Nº de escaladas (B) no Teste de Nataação Forçada (TNF) de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutiroideos (PBS) e hipotiroideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI, classificados conforme a % preferência de sacarose final. Grupo PBS (eutireóide) - N=14 (controle), N=19 (refratário), N=13 (maníaco), N=3 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=11 (controle), N=21 (refratário), N=17 (maníaco), N=7 (anedônicos). Dados representam média±SEM.

V. Caixa de locomoção espontânea

Diferenças significativas foram observadas no grupo dos machos. ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tempo X tratamento ($F_{3,135} = 3,17$; $p < 0,03$), tempo X tratamento X classificação ($F_{9,135} = 1,97$; $p < 0,05$) (Figura 58 e 59).

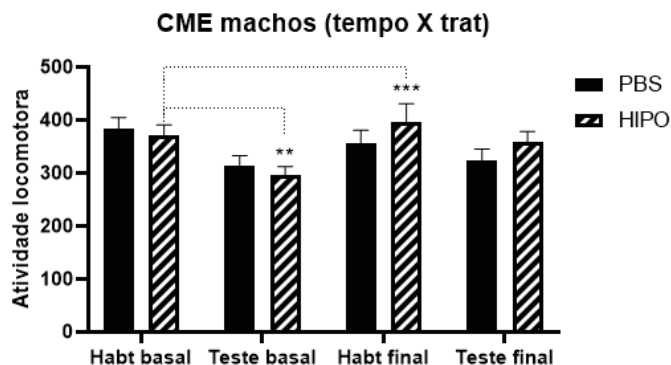


Fig. 58. Caixa de atividade locomotora: Locomoção de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutiroideos (PBS) e hipotiroideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI. Antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI; N=23 (PBS), N=30 (HIPO). Dados representam média±SEM. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado à habituação basal.

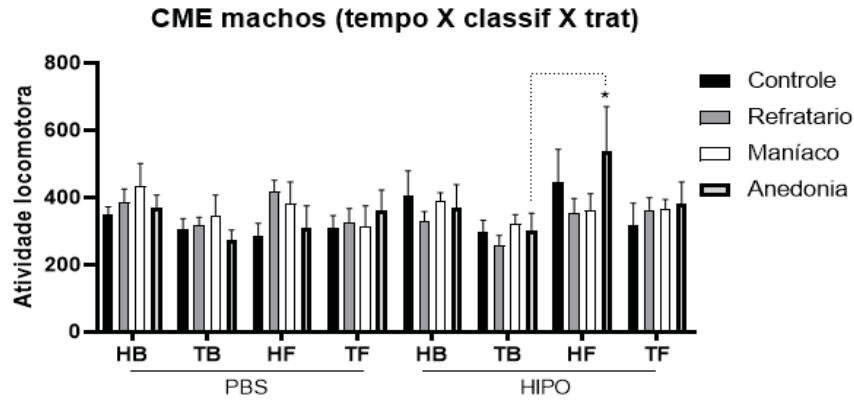


Fig. 59. Locomoção de camundongos Swiss machos eutireoideos (PBS) e hipotireoideos (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI classificados de acordo com a preferência de sacarose final. Grupo PBS (eutireoide) - N=8 (controle), N=8 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=4 (controle), N=9 (refratário), N=12 (maníaco), N=5 (anedônicos). Dados representam média±SEM. HB= habituação basal; TB= teste basal; HF =habituação final; TF= teste final. *p<0,01 comparado ao teste basal.

O grupo das fêmeas apresentou diferenças significativas para os fatores classificação ($F_{3,44} = 3$; $p < 0,05$), tempo X tratamento ($F_{3,132} = 6,59$; $p < 0,001$) e tempo X tratamento X classificação ($F_{9,132} = 2,09$; $p < 0,04$) (Figura 60).

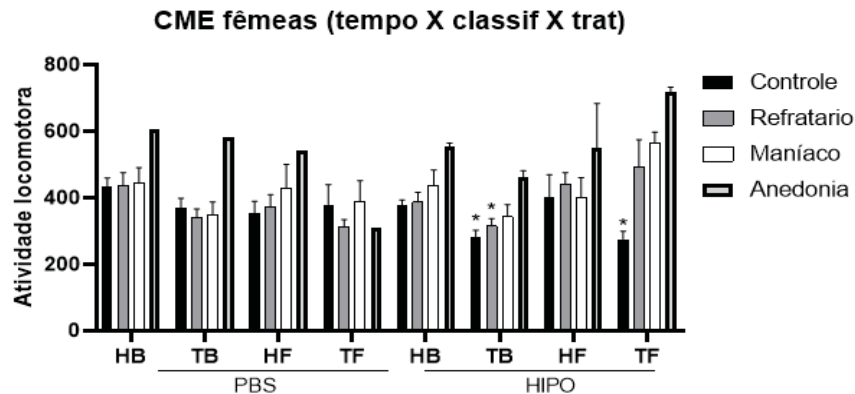


Fig. 60. Locomoção de camundongos Swiss machos e fêmeas eutireoideas (PBS) e hipotireoideas (HIPO) submetidos ao modelo de ECBRI classificados de acordo com a preferência de sacarose final. Antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Grupo PBS (eutireoide) - N=6 (controle), N=11 (refratário), N=8 (maníaco), N=1 (anedônicos); Grupo HIPO (hipotireoidismo) - N=7 (controle), N=12 (refratário), N=5 (maníaco), N=2 (anedônicos). Dados representam média±SEM. teste final. HB= habituação basal; TB= teste basal; HF =habituação final; TF= teste final. *p<0,01 comparado ao grupo anedonia TF (HIPO).

O fator sexo também foi significativo, ANOVA de medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey: fator sexo ($F_{1,89} = 9,89$; $p < 0,01$); sexo X tempo X tratamento ($F_{3,267} = 3,94$; $p < 0,01$). As diferenças observadas entre a interação dos três fatores citados são em relação ao macho PBS vs. fêmea HIPO, portanto não serão demonstradas em gráfico.

VI. Teste de esconder esferas (marble-burying)

Diferenças significativas foram observadas no grupo fêmeas e entre os sexos. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey: fator tratamento ($F_{1,44} = 4,86$; $p < 0,04$); tratamento X sexo ($F_{1,89} = 4,5$; $p < 0,04$). No entanto, o teste de Tukey não demonstrou nenhuma diferença significativa entre sexo e tratamento (Figura 61).

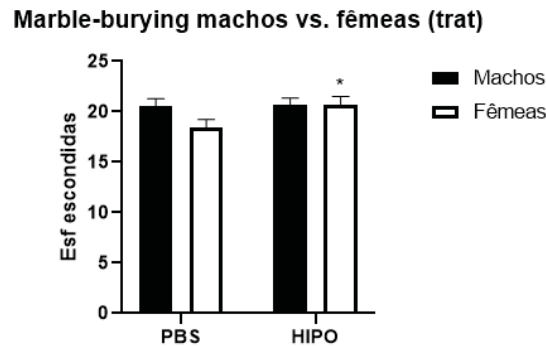


Fig. 61. Teste de Esconder Esferas: Nº de esferas escondidas de camundongos machos vs. fêmeas. Machos - N=30 (PBS), N=30 (HIPO); Fêmeas - N=26 (PBS), N=26 (HIPO). Dados representam média±SEM. * $p < 0,01$ comparado ao grupo PBS.

VII. Teste do labirinto em cruz elevado

O grupo dos machos apresentou significância quanto à classificação na porcentagem de tempo nos BA ($F_{3,45} = 4,62$; $p < 0,01$), enquanto as fêmeas obtiveram diferenças significativas no nº de entradas nos BF (tratamento: $F_{3,44} = 10,96$; $p < 0,01$) e na porcentagem de tempo nos BA (tratamento X classificação: $F_{3,44} = 3$; $p < 0,05$). ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Tukey (Figura 62 e 63).

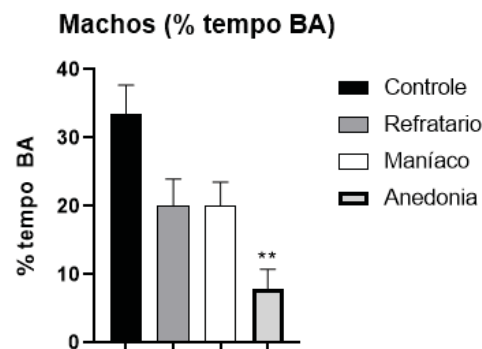


Fig. 62. Labirinto em Cruz Elevado: % de tempo nos Braços Abertos (BA) de camundongos Swiss machos eutireoideos e hipotireoideos submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI. N=12 (controle), N=17 (refratário); N=17 (maníaco); N=7 (anedonia). Dados representam média±SEM. ** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

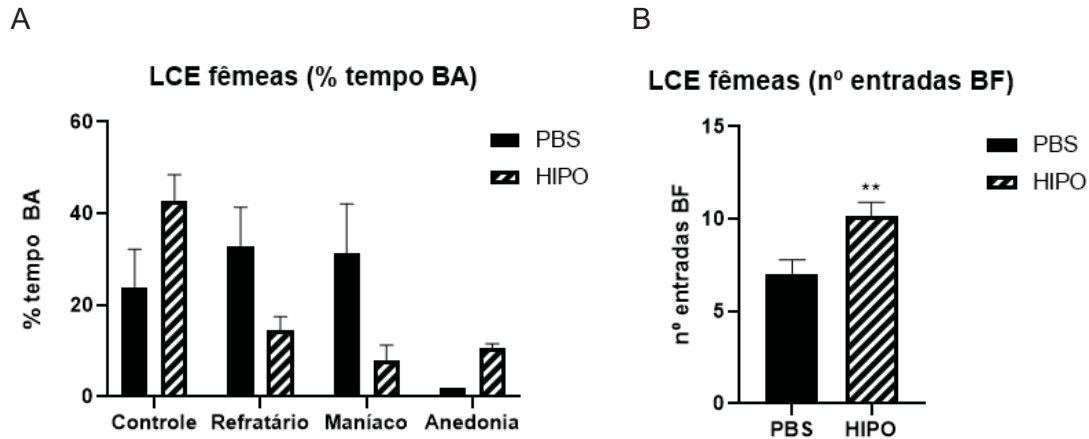


Fig 63. Comportamento no Labirinto em Cruz Elevando de camundongos Swiss fêmeas eutireoideas (PBS) e hipotireoideas (HIPO) submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI. (A) % de tempo nos Braços Abertos (BA); (B) n° de entradas nos Braços Fechados (BF); (A) N=12 (controle), N=17 (refratário); N=17 (maníaco); N=7 (anedonia). (B) N=26 (PBS), N=26 (HIPO). Dados representam média±SEM. **p<0,001 comparado ao grupo PBS.

A diferença entre os sexos somente no n° de entradas nos BF foi decorrente do maior valor obtido nas fêmeas HIPO. Porém, quando ambas as baterias foram analisadas em conjunto, observou-se significância na % dos BA quanto ao fator classificação ($F_{3,89} = 5,15$; $p < 0,01$) e tratamento X classificação ($F_{3,89} = 3,12$; $p < 0,03$) (Figura 64).

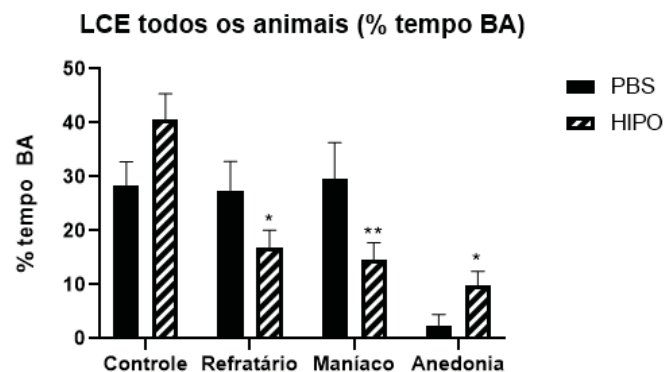


Fig. 64. Labirinto em Cruz Elevando: % de tempo nos Braços Abertos (BA) de camundongos Swiss (machos + fêmeas) eutireoideos e hipotireoideos submetidos ao ECBRI e classificados conforme a % de preferência por sacarose ao final do ECBRI. Grupo PBS - N=14 (controle), N=19 (refratário); N=13 (maníaco); N=3 (anedonia); grupo HIPO - N=11 (controle), N=21 (refratário); N=17 (maníaco); N=7 (anedonia). Dados representam média±SEM. *p<0,01 e **p<0,001 comparado ao grupo controle (HIPO).

VIII. Análise do peso

Não se observou diferenças significativas no grupo dos machos segundo ANOVA de medidas repetidas. Em uma avaliação exploratória, o *post-hoc* de Tukey sugere diferenças

significativas entre valor basal e final em todos os grupos+tratamentos, sem diferença entre os grupos.

No grupo das fêmeas, observou-se significância quanto ao fator classificação ($F_{3,44} = 4,87$; $p < 0,01$) e interação tempo X tratamento ($F_{1,44} = 4,43$; $p < 0,05$). No entanto, o *post-hoc* de Tukey não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, de tal modo que apenas a medida final difere da basal.

Todavia, o fator sexo foi significativo ($F_{1,89} = 85,87$; $p < 0,0001$), assim como a interação entre sexo X classificação ($F_{3,89} = 2,72$; $p < 0,05$), sexo X tempo ($F_{1,89} = 36,14$; $p < 0,0001$), sexo X tempo X tratamento ($F_{1,89} = 6,26$; $p < 0,03$) (Figura 65).

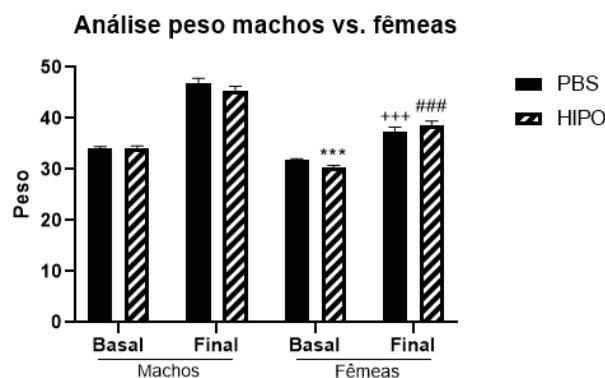


Fig. 65. Análise do peso (em gramas) de camundongos Swiss (machos e fêmeas) eutireoideos (PBS) e hipotireoideos (HIPO) submetidos ao ECBRI. Antes (basal) e após (final) modelo de ECBRI. Machos - N=30 (PBS), N=30 (T4); Fêmeas - N=26 (PBS), N=26 (T4). Dados representam média±SEM. *** $p < 0,0001$ comparado à medida basal machos (HIPO); ### $p < 0,0001$ comparado à medida final machos (HIPO); +++ $p < 0,0001$ comparado à medida final machos (PBS).

4.2.4. Quantificação hormônios tireoidianos

Para verificar se os modelos de disfunção tireoidiana exerceram efeitos sobre os níveis séricos de T3 e T4, apenas as amostras dos animais não submetidos ao modelo de ECBRI, tanto eutireoideos quanto os submetidos à indução de hipo- ou hipertireoidismo foram analisadas. Para análise por sexo, os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Tal teste foi aplicado devido à comparação de apenas dois grupos (hipo ou hipertireoide) mesmo com o baixo tamanho amostral: $n=23$ (fêmeas), $n=20$ (machos). Os dados do T3 total (TT3) passaram pelo teste de normalidade e foram analisados pelo teste *t de Student*. Nenhum dado foi significativo quanto aos níveis séricos de T3 total (TT3) comparado ao grupo controle (PBS) em ambos os sexos. Quanto aos níveis de FT4, os machos apresentaram diferenças significativas entre os animais controle (PBS) e o grupo tratado com T4; O teste utilizado foi o Mann-Whitney U test ($p < 0,01$), pois os dados dos machos não apresentavam distribuição normal. Quanto às fêmeas (o qual foi

observada distribuição normal), foi observada uma tendência à significância no FT4 do grupo tratado com T4 comparado ao grupo controle; teste *t de Student* ($t = -2,05$; $p = 0,058$).

Tabela 4. Níveis séricos de T3 total (TT3) e T4 livre (FT4) em machos tratados com PBS (controle), T4 (hipertireoidismo) e MMI (hipotireoidismo). PBS N=9; T4 N=4; MMI N=8. Dados representam média±SEM. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle.

Machos				
	Hipertireoidismo		Hipotireoidismo	
	TT3 (ng/ml)	FT4 (ng/dl)	TT3 (ng/ml)	FT4 (ng/dl)
PBS	0.61 ± 0.03	2.57 ± 0.16	PBS	0.61 ± 0.03
T4	0.65 ± 0.05	5.19 ± 0.12**	MMI	0.67 ± 0.01

Tabela 5. Níveis séricos de T3 total (TT3) e T4 livre (FT4) em fêmeas tratadas com PBS (controle), T4 (hipertireoidismo) e MMI (hipotireoidismo). PBS N=7; T4 N=10; MMI N=6. Dados representam média±SEM

Fêmeas				
	Hipertireoidismo		Hipotireoidismo	
	TT3 (ng/ml)	FT4 (ng/dl)	TT3 (ng/ml)	FT4 (ng/dl)
PBS	0.68 ± 0.03	2.67 ± 0.49	PBS	0.68 ± 0.03
T4	0.75 ± 0.08	4.06 ± 0.45	MMI	0.79 ± 0.06

4.2.5. Classificação dos animais em cada bateria

Para facilitar a visualização da diferença na distribuição dos animais por classificação, cada bateria e o N por grupo estão demonstrados nas tabelas abaixo.

Tabela 6. Porcentagem de distribuição de machos e fêmeas expostos apenas ao ECBRI entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).

Animais submetidos apenas ao ECBRI (%)		
	Machos	Fêmeas
Controle	36,95	6
Refratário	30,44	12
Maníaco	28,26	82
Anedônico	4,35	0

Tabela 7. Porcentagem de distribuição de machos e fêmeas expostos ao ECBRI e submetidos ao tratamento para indução de hipertireoidismo, entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).

Modelo de hipertireoidismo em animais submetidos ao ECBRI (%)		
	Machos	Fêmeas
Controle	9,8	18,52
Refratário	23,53	20,37
Maníaco	13,73	11,11
Anedônico	52,94	50

Tabela 8. Porcentagem de distribuição de machos e fêmeas expostos ao ECBRI e submetidos ao tratamento para indução de hipotireoidismo, entre as classificações (controle, refratário, anedônico e maníaco).

Modelo de hipotireoidismo em animais submetidos ao ECBRI (%)		
	Machos	Fêmeas
Controle	22,65	25
Refratário	32,1	44,23
Maníaco	32,1	25
Anedônico	12,97	5,77

5. Discussão

Inicialmente, o objetivo do corrente estudo foi analisar a possível expressão diferenciada do RNA no CPF de camundongos C57BL/6, decorrente de diferentes tipos de estresse pelo modelo de ECBRI. Em uma visão convencional, os animais desenvolveriam anedonia em decorrência do estresse, e seus parâmetros comportamentais e marcadores moleculares seriam analisados. No entanto, têm-se observado que nem todos os animais submetidos ao estresse crônico desenvolvem comportamento tipo-depressivo. Nesta linha, o estresse pode ser um gatilho que desencadeia sintomas tanto depressivos quanto maníacos, como é observado no transtorno bipolar. No presente trabalho, o perfil de consumo individual de cada animal evidenciou 4 tipos comportamentais: controle, refratário, anedônico e maníaco, sendo estes dados corroborados pelos agrupamentos formados na análise de componentes principais (PCA).

Uma vez que a anedonia em humanos é definida como dificuldade em sentir prazer em atividades gratificantes ou pela falta de interesse, o comportamento similar em animais é observado quando os mesmos perdem interesse por substâncias palatáveis (DSM-5; Liu, et al. 2018). Sabendo disto, o emprego do teste de preferência de sacarose para mensurar anedonia e conseqüentemente comportamento tipo-depressivo é amplamente aceito, sendo um teste padrão para análise dos efeitos do estresse crônico (Bekris et al., 2005; Wallace et al., 2009). Porém, alta preferência de sacarose em roedores é fortemente associada com hedonia e comportamento de busca de recompensas elevado, o qual é um dos sintomas relevantes do comportamento maníaco em humanos com esse transtorno. A desregulação dos sistemas de recompensa no comportamento maníaco tem sido sugerida como relevante endofenótipo para o THB (Hasler, et al. 2006), baseado em estudos clínicos que corroboram essa teoria através de parâmetros comportamentais (Johnson, 2005), neuroanatômicos e neuroquímicos (Abler, et al. 2007), além da associação com fatores genéticos específicos (Benjamin, et al. 1998). Em modelos animais, Flaisher-Grinberg e colaboradores demonstraram que altos consumos de sacarose podem ser reduzidos pelo tratamento com lítio, pontuando que tal comportamento hedônico é responsivo a estabilizadores de humor. Baseado no exposto acima pode-se inferir que, em resposta ao estresse, parte dos animais desenvolve comportamento tipo-maníaco ao invés de comportamento tipo-depressivo.

Os dados resultantes da análise de PCA validam tal idéia, uma vez que ao separarmos animais com alta preferência de sacarose em um grupo específico, a análise PCA mostrou um agrupamento destes em relação à expressão de genes. Ainda mais, o grupo anedônico

também foi agrupado similarmente quanto à expressão de genes, além de ter-se observado poucos genes expressos diferencialmente entre esses dois grupos. Interessante notar que o mesmo foi observado em relação aos animais controle e refratário, sendo possível inferir que controle e refratários poderiam ser considerados quase o mesmo grupo, ao passo que maníacos poderiam ser parte do grupo anedônico. No entanto, existem diferenças entre esses grupos similares. Entre os grupos controle e refratário, onze genes foram expressos diferencialmente (dados não mostrados), estes envolvidos em cascatas que apresentam a ativação da fosfolipase C (PLC) como mecanismo efetor, p. ex., a via de sinalização do receptor de serotonina ativador da fosfolipase C e via de sinalização mediada pela rodopsina ativadora da fosfolipase C. Interessante notar que fosfolipase C é de suma importância em várias vias moleculares relacionadas à depressão. Uma vez que o grupo refratário apresentou aumento na expressão de genes relacionados a cascatas com a ativação da PLC, pode-se sugerir que a maior atividade desta enzima pode auxiliar na refratariedade à depressão. Nesta linha, vários antidepressivos apresentam como mecanismo de ação comum a ativação da PLC, de modo que tal ativação foi relacionada com atividade serotoninérgica e efeito antidepressivo (Tyeryar et al., 2007; Galeotti et al., 2011). Ainda mais, antidepressivos aumentam a expressão de PLC no CPF, ao mesmo tempo em que estabilizam os níveis de hormônios tireoidianos (Shastry, 2004). Este achado é interessante, uma vez que disfunção tireoidiana foi observada em nossos animais anedônicos, quando feita a análise de expressão diferencial em relação ao grupo maníaco.

Por meio da análise do RNAseq e PCA, foi possível observar que ao todo quatorze genes foram expressos diferencialmente entre os grupos anedônico e maníaco, e com base nisto, ambos apresentam alterações metabólicas e disfunção dos genes relacionados ao ritmo circadiano, ao passo que animais maníacos apresentaram aumento da atividade inflamatória e longevidade diminuída. A soma de todas estas alterações pode ser tomada como um reforço da idéia de aparecimento de um grupo anedônico e um maníaco em resposta ao estresse, já que longevidade diminuída, alterações metabólicas e de sono são comuns em pacientes bipolares (Bond et al., 2010; Chouinard et al., 2016). Ainda mais, a alteração na expressão de genes relacionados à função tireoidiana também foi observada. Os resultados exibiram que animais anedônicos apresentaram aumento de 10% na expressão do gene que codifica para o TRH (prepro-*Trh*), que atua em conjunto com o T3 na regulação da homeostasia da atividade tireoidiana. Assim como o TRH é responsável por estimular a liberação de T3 (através do estímulo de TSH na glândula pituitária), o T3 também regula a biossíntese do TRH no PVN (Segerson, et al. 1987; Koller, et al. 1987), por meio do *feedback* negativo. Ou seja, quanto maior a presença de T3 no organismo, menor é a produção de TRH. Sabe-se que tal regulação ocorre a nível transcricional, de modo que a

expressão do prepro-*Trh* é negativamente regulada pelo receptor T3 β 2, este presente no hipotálamo e pituitária (Lechan, et al. 1986; Sugrue, et al. 2010). O efeito oposto também já foi documentado, no qual hipotireoidismo provocado por tireoidectomia química (droga anti-tireóide) ou cirúrgica resultou em aumento substancial no mRNA do gene prepro-*Trh* no PVN (Lechan e Kakucska, 1992), e os perfis de regulação negativa após a administração de T3 são muito semelhantes ao observado originalmente (Nolan, et al. 2004). Ainda mais, ratos submetidos à privação de 90% do sono por 20-21 dias exibiram expressão consideravelmente elevada na expressão do gene prepro-*Trh*, além do desenvolvimento de hipotireoidismo (Everson, et al. 2002), corroborando nossos dados de que o estresse também pode desencadear alterações neste gene, além de perturbar a função tireoidiana. Com base no exposto acima, pode-se supor que os camundongos anedônicos que evidenciaram tal aumento na expressão do gene prepro-*Trh* apresentavam atividade diminuída do T3, e em uma tentativa de regular a atividade tireoidiana, a expressão deste gene foi ampliada. Além disto, estudos indicam que o aumento da transcrição, tradução e processamento pós-tradução do prepro-*Trh* resulta em não apenas mais TRH, mas também outros peptídeos derivados deste gene que podem ter um papel no alívio dos sintomas depressivos (Pekary et al., 1997; Redei, et al. 1995). Estes peptídeos incluem o Ps4, que aumenta atividade do TRH, e Ps5, um fator inibidor do CRH, que coordena a atividade do eixo HPA, como citado anteriormente. No que concerne o Ps4, este não possui qualquer atividade semelhante ao TRH, apesar deste aumentar consideravelmente o TSH na pituitária (Bulant, et al. 1990; Pekary e Sattin, 2001). Portanto, o aumento na expressão do TRH observado nos camundongos deste estudo poderia ser outro mecanismo homeostático em resposta ao estresse crônico.

Portanto, é possível dizer que, com base nos resultados que obtivemos, animais com comportamentos tipo depressivos apresentam alterações sugestivas de hipotireoidismo em comparação aos camundongos com comportamentos tipo maníacos. No entanto, a correlação da expressão do gene *Trh* entre o grupo anedônico e maníaco demonstra expressão diminuída deste gene no grupo maníaco (Figura 8). Ou seja, baseado nos dados apresentados neste estudo, os animais com comportamentos tipo maníacos poderiam apresentar concentrações maiores de T3, indicando um possível estado de hipertireoidismo. Poucos estudos relacionam disfunções tireoidianas e comportamento maníaco, e quanto aos dados existentes (Lee e Hutto, 2008), estes relacionam mania ao hipertireoidismo. Apesar da terapia com lítio (tradicionalmente utilizada para tratar o THB) mascarar as características do hipertireoidismo (por tratar a tirotoxicose), a retirada desta tem sido associada com a piora do quadro maníaco, de modo que as características clínicas mais comuns do hipertireoidismo e tirotoxicose têm sido ansiedade e depressão (Chakrabarti,

2011). No entanto, já foi demonstrado que disfunções tireoidianas coexistem com episódios mistos e quadros maníacos (Chakrabarti, 2011; Cassidy, et al. 2002, Rao, et al. 2012), de modo que pacientes com mania mista apresentaram níveis elevados de TSH quando comparados a pacientes com mania pura (Chang, et al. 1998). Por fim, diversos estudos reportam que a prevalência geral de um transtorno psiquiátrico sindrômico no hipertireoidismo é cerca de 10% (Bauer, et al. 2008). Os dados de estudos pré-clínicos também são escassos – um estudo reporta aumento da atividade locomotora em camundongos com atividade da Dio3 diminuída – o que resulta em aumento dos níveis de T3, ao menos no SNC (Stohn, et al. 2019). Entretanto, esses dados levantaram várias dúvidas, e a principal seria se a indução do hipertireoidismo/ hipotireoidismo alteraria o comportamento dos animais de forma diferente do que apenas o modelo de ECBRI. Ainda mais, fêmeas foram adicionadas ao protocolo experimental, devido ao dimorfismo sexual presente tanto nos transtornos de depressão, quanto nos transtornos de disfunção tireoidiana em dados clínicos. Devido a algumas diferenças no protocolo experimental da primeira fase, um grupo de camundongos Swiss de ambos sexos foi submetido ao ECBRI, para estabelecimento da classificação basal dos animais, sem interferência de tratamentos.

Quanto às diferenças no modelo experimental da primeira e segunda fase, a primeira seria o fato de que na primeira bateria utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6 machos, a linhagem cosanguínea (geneticamente homogêneas) mais conhecida e amplamente utilizada para análises com antecedentes genéticos (Mekada, et al. 2009). Por exemplo, tais linhagens cosanguíneas foram originalmente desenvolvidas para demonstrar as bases genéticas de vários tipos de câncer, e permite que experimentos de diferentes áreas biomédicas possam ser reproduzidos com o mesmo material genético (Silver, 1995). Uma vez que o objetivo era analisar o transcriptoma no CPF, foi necessário utilizar animais que possuem homogeneidade genética. Deste modo, as diferenças na atividade do RNA detectadas não seriam de diferenças genéticas do próprio indivíduo, mas sim decorrentes do modelo de estresse. Além do mais, essa é a mesma linhagem utilizada no Instituto Karolinska (Estocolmo, Suécia), local onde a análise do RNAseq foi executada (projeto CAPES-STINT). Os testes comportamentais da segunda fase empregaram camundongos Swiss machos e fêmeas, pela falta de disponibilidade de camundongos C57BL/6 durante a execução o projeto. Apesar desta limitação, a utilização de duas linhagens diferentes pode servir como medida para avaliar a reprodutibilidade e generalização de resultados. Uma vez que o estudo foi de caráter exploratório, é interessante comparar as possíveis diferenças entre as linhagens, indicando qual seria mais interessante para os estudos posteriores. Outro fator interessante que notamos foi que isolamento por si só seria um estressor forte o suficiente para alterar o comportamento de alguns animais mais suscetíveis ao estresse.

Estudos anteriores corroboram a idéia de que isolamento social é um forte estressor para roedores (Malick, 1979; Fone e Porkess, 2008), portanto para a segunda fase os animais do grupo controle foram mantidos em grupos de 3 a 5 animais por caixa, sendo estes isolados apenas uma vez por semana, no teste de preferência de sacarose. Os animais do grupo estresse foram mantidos isolados após o início do ECBRI. Por último, foram adicionados ao delineamento experimental testes comportamentais para verificar a existência de comportamento tipo-depressivo ou tipo-ansioso (onde alguns parâmetros podem ser considerados comportamento tipo-maníaco, como será discutido na sequência).

Foi possível observar que o modelo de ECBRI foi eficaz na alteração comportamental, tal como os tratamentos, se observarmos a distribuição diferencial dos animais quanto à classificação. Este modelo originalmente proposto por Katz et al. (1981) e posteriormente aperfeiçoado por Willner (1997) é amplamente aceito e utilizado como modelo animal de depressão e já se mostrou como indutor de alterações comportamentais, neurobiológicas e endocrinológicas em roedores (Willner et al., 1992; Moreau et al., 1993; Kioukia-Fougia et al., 2002; Bekris et al., 2005). Ao se utilizar tal protocolo, que consiste em estressores leves aplicados por um longo tempo, observam-se parâmetros como aumento dos níveis de corticosterona, diminuição dos níveis de BDNF e aumento de citocinas pró-inflamatórias, bem como a anedonia, o que mimetiza alguns dos sinais e sintomas observados em pacientes em depressão (Duman *et al.* 2000; Kubera *et al.* 2004; Mössner *et al.* 2007). No entanto, ampliar a interpretação dos comportamentos observados em relação à preferência de sacarose é um ponto interessante para manter a confiabilidade do modelo, pois há uma parcela de laboratórios (21%, segundo uma pesquisa) que apresentam dificuldade na obtenção da resposta anedônica (Willner, 2017). Deste modo, o modelo do ECBRI poderia ser empregado no estudo do THB, apesar de não se observar comportamento tipo depressivo e maníaco no mesmo animal. Ainda, a indução do comportamento tipo-maníaco no animal mimetizaria melhor o que se observa em humanos, onde o estresse prolongado pode resultar em quadro maníaco, e não necessariamente depressivo, ou mesmo nenhuma alteração psicopatológica (pessoas resilientes ao estresse). Para o estudo da mania hoje em dia os modelos estão relacionados com a indução de hiperatividade através da administração de psicoestimulantes (tais como anfetamina) ou pela privação de sono, sensibilização por morfina, comportamento de risco, comportamento agressivo e alguns modelos genéticos (Gessa *et al.* 1995; Niculescu *et al.* 2000; Flaisher-Grinberg *et al.* 2010; Grappi *et al.* 2011; Pereira, et al. 2011). Até o presente momento, o modelo mais bem estabelecido para o estudo da mania é o de hiperatividade desencadeada pela administração de psicoestimulante. A estimulação por anfetamina seguida por teste de campo aberto apresenta uma boa validade preditiva e de face, mas não reproduz várias das

alterações psicopatológicas que ocorrem na fase maníaca, mas apenas a hiperatividade dos pacientes durante o episódio maníaco (Decker, et al. 2000; Einat, 2000; Nestler, et al. 2002; Perry, et al. 2010).

Desde que nenhum teste ou modelo único é uma medida de análise independente e aceitável (Wang, et al. 2017), várias análises comportamentais foram utilizadas no presente estudo. As combinações de comportamentos ansiosos, depressivos, de desamparo e anedonia podem ser usadas para avaliar a ocorrência e a severidade do comportamento tipo-depressivo, e na classificação empregada, para validar a alta preferência de sacarose como um comportamento maníaco.

No que concerne os testes que mensuram comportamento tipo-depressivo, foram utilizados o teste do ninho, uma medida de atividade auto-centrada, não foi diferencialmente significativa em nenhum dos grupos. No entanto, pôde-se observar que os machos do primeiro grupo (apenas ECBRI) obtiveram pior desempenho na análise do estado geral da pelagem, de modo que apenas o grupo controle destes apresentou baixo escore, indicando melhor estado da pelagem. Nas fêmeas, interessante observar que apenas o grupo refratário apresentou escore alto, enquanto os grupos controle e maníaco obtiveram estado geral da pelagem adequado. Já nos grupos de indução de hipertireoidismo e hipotireoidismo, notou-se que o tratamento levou à piora da pelagem em todas as classificações nos machos; nas fêmeas, apenas o tratamento com MMI piorou o estado da pelagem em todos os grupos, sendo que no tratamento com T4, o grupo maníaco manteve o mesmo escore baixo dos controles. Em roedores, o comportamento de auto-limpeza consideravelmente sensível ao estresse (Kalueff e Tuohimaa, 2004 a,b). No modelo de ECBRI, a deterioração do pelo pode ser relacionada à diminuição da auto-limpeza (*grooming*), e em consequência, à perturbação de atividades auto-centradas no animal. Em humanos, tal comportamento pode ser correlacionado com baixa higiene pessoal que muitos pacientes com depressão apresentam. Sendo assim, mesmo com a distribuição heterogênea entre os grupos maníaco e anedônico entre as baterias de testes, pôde-se observar que os machos parecem mais vulneráveis à indução do comportamento tipo-depressivo do que as fêmeas. Ainda mais, o fato do grupo maníaco das fêmeas apresentar bom estado da pelagem pode ser correlacionado com o comportamento tipo-maníaco em humanos, pois aumento da auto-estima e no nível de energia são alguns dos sintomas observados (Akiskal *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2005).

O teste de natação forçada foi descrito por Porsolt e colaboradores em 1977 primeiramente em ratos, e subsequentemente, em camundongos. Este modelo é de rápida execução (boa replicabilidade) e de boa validade preditiva, sendo por isto amplamente

utilizado para detectar o potencial efeito antidepressivo de novas drogas (Porsolt *et al.* 1978; Borsini e Meli, 1988; Demouliere *et al.* 2005). Esse teste consiste em analisar o tempo de imobilidade dos animais (Porsolt, *et al.*, 1977), pois sua premissa é a de que em uma situação de estresse inescapável, ratos e camundongos adquirem uma postura de imobilidade, esta reduzida por fármacos antidepressivos. O comportamento normal de um animal é, após movimentos iniciais vigorosos para a fuga dirigida para fora do cilindro de água, a alternância de imobilidade (ou de movimentos mínimos apenas para manter a cabeça fora da água) e movimentos de fuga (natação e escalada das paredes laterais), sendo que drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade. Um aumento do tempo de imobilidade, como o observado nos animais do grupo estressado, indicaria um comportamento tipo depressivo; este fator pode ser correlacionado com o transtorno em humanos, pois pacientes depressivos tendem a repetir os comportamentos, ou seja, não possuem maior capacidade de mudar de estratégias como os indivíduos que não sofrem desta doença. Neste estudo, foram observadas diferenças significativas apenas no grupo tratado com T4 (hipertireoidismo). A diferença ocorreu entre os sexos, de modo que os machos apresentaram maior tempo de imobilidade e de número de escaladas. Apesar dos fatores tratamento e classificação não mostrarem significância, estes resultados sugerem a maior vulnerabilidade dos machos ao estresse, como visualizado no teste de análise do pelo. Além disto, estudos reportam dimorfismo sexual de ratos submetidos ao ECBRI, no qual fêmeas exibiram um comportamento mais ativo durante a segunda exposição ao TNF, ao passo que os machos apresentaram diminuição do comportamento ativo e níveis elevados de corticosterona após o TNF (Dalla, *et al.* 2005). Ainda mais, foi demonstrado que ratos Long-Evans submetidos ao ECBRI demonstraram mais comportamentos passivos na sessão teste do TNF, no qual as fêmeas não foram afetadas (Bielajew, *et al.* 2003). Importante citar que o teste em camundongos consiste em apenas uma sessão de 6 minutos, tal que a habituação ocorre nos primeiros 2 minutos de nado – período que não é avaliado, pois inicialmente os animais nadam vigorosamente na tentativa de fuga. Sendo assim, o maior tempo de imobilidade nos machos não seria decorrente da habituação dos animais ao teste pela exposição repetida (Mezadri e Batista, 2011).

Sabe-se que a ansiedade é uma das comorbidades associadas tanto ao transtorno de depressão (Hasler, *et al.* 2004) quanto ao THB (Regier, *et al.* 1998). Com o objetivo de se realizar uma análise comportamental mais ampla, foram aplicados testes de ansiedade, como o teste de esconder esferas (marble-burying), que consiste em avaliar um comportamento inato do animal: frente a objetos novos, camundongos tendem a enterrá-los. Este é um teste com boa validade preditiva e útil para verificar comportamento tipo-ansioso nos animais (Cryan e Sweeney, 2011). Em nossos animais, a observação mais relevante foi

o dimorfismo sexual quanto a resposta ao teste. As fêmeas, quando submetidas apenas ao ECBRI, enterraram mais esferas quando comparadas aos machos. Quando tratadas com T4 para indução do hipertireoidismo, exibiram comportamento menos ansioso, devido ao menor número de esferas enterradas. No grupo com indução ao hipotireoidismo, não foram observadas diferenças entre os sexos, mas o tratamento com MMI foi eficaz em induzir comportamento tipo-ansioso apenas nas fêmeas. Com o intuito de evitar falsos positivos, o teste do LCE também foi incluído no delineamento experimental. Nenhum resultado falso positivo do marble-burying foi detectado, pois o menor tempo nos BA em fêmeas corroborou os dados obtidos no teste de esconder esferas. Interessante notar que o grupo hipertireoidismo apresentou diferenças significativas com um n maior (tal que o fator sexo não foi fator divergente), de modo que o grupo anedônico permaneceu menor tempo nos BA. Este comportamento tipo-ansioso também foi observado no grupo hipotireoidismo, sendo os machos anedônicos com comportamento tipo-ansioso elevado. No caso das fêmeas, apesar do *post-hoc* de Tukey não apresentar diferença estatística entre os grupos, os dados sugerem menor tempo nos BA em todos os grupos tratados para hipotireoidismo, exceto o controle. Os BA são um estímulo aversivo a roedores (devido ao espaço aberto e alto), de modo que naturalmente estes animais tendem a ficar maior tempo nos BF (Krauter, et al. 2019). Pode-se afirmar, com base nos dados acima, que tanto o modelo de ECBRI quanto os tratamentos foram eficazes em exibir o comportamento tipo-ansioso. Ainda mais, os resultados apresentaram dimorfismo sexual, de modo que as fêmeas, com exceção do grupo controle, parecem mais sensíveis aos testes de ansiedade. Curiosamente, as fêmeas tratadas para hipotireoidismo apresentaram aumento significativo da atividade locomotora, representado pelo número de entradas nos BF, levantando a dúvida se estas fêmeas na verdade não apresentariam comportamento tipo-maníaco. Este número elevado de entradas no BF pode indicar comportamento impulsivo (também presente em pacientes maníacos), e consiste na incapacidade de reter, parar ou adiar uma resposta, sendo a escolha impulsiva resultado de um processo informado pela motivação e/ou estado afetivo (Swann, 2009; Dent e Isles, 2014). Atualmente, alguns laboratórios têm empregado o LCE para avaliar comportamento impulsivo, como maior tempo nos BA, que indica comportamento de risco e procura por novas sensações (Laviola, et al. 2003; Plagge, et al. 2005). Mesmo assim, o número exarcebado de entradas nos BF pode ser um indicativo de impulsividade, no entanto mais testes direcionados para tal comportamento serão necessários.

A avaliação da atividade locomotora foi empregada principalmente para verificar se os resultados nos testes comportamentais anteriores seriam decorrentes de possíveis déficits na locomoção. Por esta razão, o teste foi aplicado antes e após o modelo do ECBRI,. Com

base nos resultados obtidos, podemos afirmar que os resultados nos testes de TNF, LCE e marble não são decorrentes de alterações na locomoção dos animais. No entanto, esse teste é usualmente utilizado para mensurar hiperlocomoção em modelos de mania (Gessa, et al. 2005), podendo indicar comportamento tipo maníaco, pois mimetiza o fenótipo exploratório observado em pacientes com mania (Perry et al., 2009; Young et al., 2010). As diferenças significativas entre os grupos quanto à locomoção demonstram que os animais alterados apresentavam hiperlocomoção, o qual pode ser uma medida de comportamento tipo-maníaco, como citado anteriormente. Nesta linha, observou-se que os animais (machos + fêmeas) maníacos apresentaram atividade locomotora final elevada comparado à respectiva medida teste basal. Ainda mais, quando os sexos foram avaliados separadamente, observou-se que as fêmeas maníacas também apresentavam a mesma resposta, enquanto uma tendência é observada no grupo dos machos. Ou seja, antes do ECBRI, este grupo de animais foi capaz de se habituar à caixa de locomoção, demonstrando que o modelo de estresse pode ter induzido tais características, como impedir a habituação dos animais, demonstrado pela hiperlocomoção. Ainda mais, o aumento da atividade locomotora nas fêmeas do grupo maníaco corrobora a classificação decorrente da preferência de sacarose. Quanto ao tratamento para indução do hipertireoidismo, não foram observadas diferenças estatísticas, apesar dos gráficos demonstrarem uma tendência à maior locomoção basal nos animais tratados com T4. Já no grupo tratado para hipotireoidismo, foram observadas várias interações significativas. Os machos anedônicos tratados com MMI apresentaram alta locomoção final quando comparada à locomoção do teste basal, indicando que apesar da habituação adquirida no teste basal, a exposição ao ECBRI associada ao tratamento resultou em hiperlocomoção. O mesmo efeito foi observado nas fêmeas, mas diferenças sexuais foram observadas quanto à locomoção – fêmeas tratadas com MMI tiveram atividade locomotora maior do que os machos com o mesmo tratamento, indicando que o MMI pode ter diminuído a locomoção nos machos. Ainda mais, a dificuldade de habituação pode ser decorrente de alterações cognitivas. Um fator importante que pode ter sido modificado são os níveis de BDNF, pois estudos clínicos relatam níveis diminuídos de BDNF em pacientes bipolares, tanto na fase maníaca quanto na depressiva (Cunha e Frey, 2006; Scola and Andrezza, 2015; Teixeira et al., 2016). Neste contexto, a diminuição de BDNF no prosencéfalo tornou camundongos fêmeas mais sensíveis à expressão de diversos sintomas tipo-depressivos após o ECBRI (Autry, et al. 2009). Particularmente, a aplicação deste modelo resultou em reduzida atividade locomotora apenas em camundongos machos, enquanto que a deleção do BDNF no prosencéfalo afetou a atividade motora basal e induzida por ECBRI de maneira sexo-dependente: machos nocaute (KO) para BDNF eram basalmente hiperativos, ao passo que o ECBRI induziu atividade locomotora reduzida nas fêmeas KO. Nosso estudo no caso

demonstrou dimorfismo sexual tratamento-dependente pelo MMI, de modo que as fêmeas apresentavam elevada atividade locomotora. Isto não necessariamente reflete que os níveis de BDNF das fêmeas estariam mais altos, pois devido às semelhanças na expressão do RNAm entre os grupos anedônico e maníaco, a hiperatividade observada é um tipo de resposta decorrente do estresse. O estresse é conhecido por ser um agente modificador dos níveis de BDNF, levando à sua diminuição (Shirayama *et al.* 2002; Saarelainen *et al.* 2003; Sairanen *et al.* 2005; Berton e Nestler 2006; Li *et al.* 2008).

Diferenças sexuais significativas quanto à preferência de sacarose também foram observadas. Na primeira bateria, as fêmeas apresentavam preferência basal de sacarose maior do que os machos, sendo que tal preferência aumentou após o estresse crônico. Por tal razão, elas foram quase todas classificadas em maníacas. Esta alta preferência de sacarose já foi observada em outros estudos, de modo que a preferência por soluções doces parece ser estradiol-dependente (Clarke and Ossenkopp, 1998). De fato, estudos pré-clínicos reportam que fêmeas, em comparação aos machos, apresentam ativação do eixo HPA mais robusta, como resultado dos níveis circulantes de estradiol que elevam os níveis de corticosterona durante situações não ameaçadoras, assim como durante e após exposição a estressores (Oyola e Handa, 2017). Ainda mais, Weiser e Handa (2009) demonstraram que o tratamento com estradiol foi capaz de inibir o feedback negativo da dexametasona (um glicocorticoide sintético). Sendo assim, a resposta hedônica elevada nas fêmeas pode ser decorrente de perturbações no ciclo estral, que podem ter afetado os níveis de estradiol potencializando a hiperatividade do eixo HPA. Ainda mais, a atividade dopaminérgica (altamente ligada ao hedonismo e comportamento maníaco) (Ashok, *et al.* 2017) é elevada em ratas, mas não em ratos (Mitsushima, *et al.* 2006).

Sabe-se que tanto transtornos de depressão e mania levam à alterações no peso, seja por alterações no apetite e/ou metabólicas (DSM-V), e deste modo, o controle do peso corporal é útil para análise do estado geral do animal, em conjunto com a análise do pelo. Importante citar, primeiramente, que os machos normalmente pesam mais por serem maiores, então a diferença observada entre os sexos, com exceção da primeira bateria, é decorrente desta natureza fisiológica. O modelo de ECBRI levou todos os grupos dos machos (com exceção do grupo controle) ao aumento substancial do peso basal vs. final. Tal diferença foi observada em fêmeas, mas apenas nos grupos refratário e maníaco. Nos grupos com indução de disfunções tireoidianas, nosso maior interesse era avaliar se os tratamentos aplicados eram condizentes com os dados observados em humanos, onde pacientes com hipertireoidismo podem apresentar perda de peso (devido ao metabolismo acelerado, que resulta na degradação de músculo) (Ross, *et al.* 2016), enquanto alguns

indivíduos com hipotireoidismo apresentam ganho anormal de peso (Breta, et al. 2013). Apesar de alterações no peso não serem observadas em todos os estudos envolvidos com modelos de disfunção tireoidiana, sabe-se que HT estão envolvidos na homeostasia de energia e mudanças no peso, devido o seu papel na regulação da temperatura corporal e taxa metabólica basal (Pontikides e Krassas, 2007). Nesta linha, observamos que o tratamento por três semanas com T4 alterou inicialmente o ganho de peso em machos, quando o ECBRI foi iniciado, de modo que eles apresentaram peso menor nas medidas basal e final, quando comparados ao grupo PBS. Já nas fêmeas tratadas com T4, foi observada uma variação maior ao longo do tempo, como observado no estudo de Rakov et al. (2016). No entanto, as fêmeas do grupo refratário e anedônico demonstraram maior ganho de peso ao longo do ECBRI, e tal alteração ocorreu pelo modelo de estresse, e não necessariamente pelo tratamento. Nenhuma diferença significativa (além do dimorfismo sexual comumente observado) ocorreu devido ao tratamento com MMI, para indução do hipotireoidismo. No entanto, o estudo com o mesmo modelo aplicado também não induziu alterações no peso (Rakov, et al. 2016). Neste estudo, observou-se que o modelo de hipertireoidismo elevou a temperatura corporal nas fêmeas, tanto no modelo de hipertireoidismo, quanto no modelo de hipotireoidismo, assim como um aumento significativo na taxa de batimentos cardíacos em ambos sexos com hipertireoidismo, fatores que poderiam influenciar na alteração do peso.

Quando se compara os grupos, pode-se notar que o tratamento com T4 e MMI não induziram alterações significativas em todos os testes comportamentais, de modo que ambos tratamento pioraram o estado geral da pelagem, assim como elevaram o comportamento tipo-ansioso dos animais no LCE. Quanto a mudança de peso, apenas o T4 nos machos induziu tal alteração metabólica, indicando que apenas a indução por T4 pode ter sido eficaz. De fato, a única medida diferencial quando se analisou os níveis de HT no soro foi o FT4 nos machos, sendo que os níveis dobraram. Nas fêmeas, não houve diferença significativa neste tratamento, mas os dados demonstram que houve um aumento comparado ao grupo PBS. Tal resultado nas fêmeas pode ser sexo-dependente, uma vez que os estrogênios aumentam a capacidade de ligação do T4 a globulinas, de modo que o T4 livre pode ser menor em fêmeas (Engbring e Engström, 1958; Franklin, et al. 1985). Assim, a medida do T4 total (TT4) poderia ter exibido diferenças nas fêmeas (Rakov, et al. 2016). No entanto, há uma facilidade na detecção do FT4 comparado ao T3 livre (FT3), que deve-se ao fato de sua concentração sérica é 100 vezes maior que a de FT3. Ainda, o FT4 livre em maior quantidade sugere uma atividade secretora maior da glândula tireóide, além de poder indicar se há deiodinação alterada. Pelas razões citadas, e com o intuito de detectar se os modelos de disfunção tireoidiana alteraram tais níveis, foram escolhidas

medidas diferentes destes hormônios (dado que a quantidade de soro não permitia mais análises). Ainda, a maioria do T3 no soro deriva-se do metabolismo extra-tiroidal do T4, sendo que em ratos, o T4 convertido corresponde de 40-50% do T3 total no soro (Ortiga-Carvalho, et al. 2016). Em nosso estudo, mesmo com a quantificação do TT3, não foi possível observar alterações nos níveis deste hormônio nos sexos e nos modelos de disfunção tireoidiana. Mesmo que o aumento do FT4 não tenha sido exagerado, os resultados indicam que uma disfunção na atividade tireoidiana ocorreu, podendo ser pela maior atividade secretora da glândula tireóide (o qual não poderia ser diferenciado apenas com o TT4), decorrente de aumento do TSH (Ortiga-Carvalho, et al. 2016). Estudos clínicos que analisaram os níveis de T4 no soro demonstram que alguns pacientes apresentam um ligeiro aumento do T4 comparado à pacientes não-psiquiátricos. Tais níveis foram normalizados após a remissão dos sintomas por tratamento do transtorno (Chopra, et al. 1990). Um mecanismo que explica o aumento do T4 na depressão é a ativação do TRH hipotalâmico e subsequente aumento da função tireoidiana secundária ao aumento anormal do cortisol (Baskin, et al. 2002; Jackson, 1998; Bahls e De Carvalho, 2004). Uma vez que um efeito direto de antidepressivos na inibição da secreção do TRH já foi demonstrado (Jackson e Luo, 1998), pode-se sugerir que a diminuição dos níveis de T4 após tratamento com antidepressivos é um efeito secundário ao TRH. Interessantemente, os animais anedônicos analisados por RNAseq deste estudo apresentaram expressão aumentada do gene *prepro-Trh*, confirmando sua ligação com comportamento tipo-depressivo nos camundongos. Outra hipótese é de que ocorreu redução na deiodinação do T4 para o T3 (catalisado periféricamente pela deiodinase tipo 1 – Dio1). Tal efeito é relatado em pacientes depressivos, pois anormalidades tireoidianas nestes indivíduos muitas vezes consistem principalmente de elevados níveis de T4, baixos níveis de T3, resposta reduzida do TSH ao TRH e concentrações elevadas de TRH no fluido cerebrospinal (Bauer, et al. 1990; Jackson 1998; Sullivan, et al. 1999). Curiosamente, estudos clínicos reportam que pacientes com depressão moderada, não-medicados e sem doenças adicionais exibiam produção diária normal de T3, mas altas concentrações de T4, o que suporta a hipótese de deiodinação reduzida (Kirkegaard, et al. 1990). Ainda mais, nossos dados sugerem que o hipertireoidismo está mais associado a comportamento tipo-depressivo, uma vez que a quantidade de animais classificados como anedônicos após o ECBRI foi maior quando comparado a outros grupos.

Apesar de não terem sido observadas alterações séricas nos níveis de HT nos animais tratados com MMI, ainda assim foram observadas alterações comportamentais significativas quanto ao fator tratamento. Portanto, a atividade da Dio2 e Dio3, presentes no cérebro, pode ter sido alterada e, deste modo, a concentração e atividade de HT no cérebro, que depende

principalmente da atividade das deiodinases, pode ter sido diferente dos parâmetros observados periféricamente. Diversos estudos reforçam tal idéia, como o trabalho de Shukla et al. (2009), que observaram que ratos da linhagem WKR com tratamento materno com T4 apresentaram hipotireoidismo periférico, mas hipertireoidismo central, especificamente na amígdala. Neste estudo, a Dio3 (a enzima que inativa T3) e MCT-8 (uma proteína transportadora neuronal de T3) aumentaram no hipocampo e na amígdala. Mesmo com níveis elevados de Dio3, o estado de hipertireoidismo pode ser devido em parte ao aumento do nível de MCT-8. Achados anteriores sugerem que o Dio2 é responsável por produzir cerca de 80% de T3 no cérebro de rato adulto, através da conversão local em astrócitos (Bianco et al. 2002). Mesmo assim, camundongos knockout para Dio2 exibiram desenvolvimento e função cerebral adequados, mesmo com a falta de produção de T3 no cérebro, indicando que o T3 coletado da periferia é suficiente para suprir a necessidade cerebral (Galton et al. 2007). O estudo realizado por Glomik et al. (2020) mostrou que ratos WKR apresentam uma tendência de níveis mais altos de T3 e TSH no sangue, e também níveis mais baixos de T3 no córtex frontal e hipocampo. Além disso, os dados mostraram diferentes níveis de Dio2, Dio3 e TR α 1 no córtex frontal e hipocampo de ratos WKR e Wistar, bem como as alterações foram mais pronunciadas quando a última linhagem foi tratada com PTU. A função enfraquecida dos hormônios tireoidianos nesse modelo de depressão levou a mecanismos compensatórios, na tentativa de contrabalançar a menor concentração desse hormônio. Tais mudanças estão de acordo com vários resultados que indicam que em uma situação desfavorável, mecanismos de proteção são induzidos em maior extensão no hipocampo do que no córtex frontal (Kucharczyk et al. 2018; Glombik et al. 2020). A atividade das deiodinases também foi acessada por Stohn et al. (2016; 2019) através de diferentes modelos genéticos que causaram uma deficiência na atividade de Dio3 em camundongos de ambos os sexos. No primeiro estudo, camundongos KO ao Dio3 apresentaram hipertireoidismo central e hipotireoidismo periférico, pois os níveis elevados de T3 no cérebro estão relacionados com a diminuição do comportamento tipo depressivo observado em ambos os sexos. Diferenças comportamentais foram encontradas apenas em um teste de ansiedade, no qual os machos KO parecem apresentar maior nível de comportamento tipo-ansioso do que as fêmeas. No segundo relato, eles desenvolveram camundongos KO condicionais ao Dio3, e a diminuição substancial desta enzima não resultou em alterações em T3 e T4, embora camundongos fêmeas de ambos os grupos apresentassem níveis mais baixos de TSH do que machos. Neste modelo genético, a fêmea apresentou maior fenótipo tipo ansiedade.

Em relação ao dimorfismo sexual, Stohn et al. (2016; 2019) mostraram diferenças na expressão gênica dependente de T3, além dos resultados em ambos estudos serem, de

alguma forma, opostos. Isso provavelmente se deve à fase em que a deficiência de Dio3 foi induzida – no primeiro, os camundongos já estavam KO desde o nascimento, enquanto no segundo estudo essa condição foi induzida por volta dos dois meses de idade (KO-condicional). Nos camundongos KO-Dio3, os machos apresentaram mais genes dependentes de T3 expressos diferencialmente do que as fêmeas, enquanto estes últimos apresentaram expressão diminuída de Dio2 no córtex. Na situação condicional KO, camundongos fêmeas apresentaram (independente da deficiência de Dio3) maior expressão de alguns genes dependentes de T3 no corpo estriado. Em relação à expressão de Dio2, os machos apresentaram maior expressão no córtex, enquanto níveis aumentados de sua expressão foram detectados no estriado das fêmeas. Tais resultados sugerem a relevância do Dio3 sobre o comportamento durante o desenvolvimento cerebral. Além disso, evidências anteriores ligaram os hormônios esteróides sexuais com a sinalização do Dio3 e do hormônio tireoidiano. Alguns dados apontam que a expressão transitória alta de Dio3 em áreas específicas do cérebro em desenvolvimento, como amígdala e áreas hipotalâmicas e pré-ópticas, que são ricas em receptores androgênicos e de estrogênio, podem estar envolvida na diferenciação sexual cerebral (Wasco et al. 2003; Escamez et al. 1999; DonCarlos, 1996; Stohn et al. 2019). O dimorfismo sexual da função tireoidiana parece existir desde o início do desenvolvimento. Ainda mais, os níveis de hormônios tireoidianos no cérebro são diferentes entre os sexos durante o desenvolvimento inicial (Yamaguchi et al. 2017; Niiyama et al. 2020). Além disso, há correlação positiva entre os níveis de mRNA de progesterona e Dio2, de modo que a falta deste hormônio esteroide resulta na menor expressão de Dio2 em vários tecidos (incluindo o cérebro), sendo observada menor conversão periférica de T4 para T3, tal que o mesmo pode ter ocorrido no cérebro (Awad e Alrefaie, 2014). Diferenças sexuais também foram encontradas no comportamento e morfologia neuronal em um modelo animal de hipertireoidismo farmacológico. Niyama et al. (2020) observaram que camundongos fêmeas com hipertireoidismo tinham uma morfologia de coluna diminuída, resultando na formação de espinhos de tamanho pequeno no giro denteado, resultando em sinapse celular diferencial entre os sexos. Tal mudança no tamanho da coluna pode estar relacionada a diferentes comportamentos entre os sexos – apenas as fêmeas apresentaram comportamento tipo depressivo. Tal estudo é corroborado por dados que mostram uma correlação positiva entre tratamento com antidepressivo o tamanho da espinha dendrítica no hipocampo. A morfologia glial do cérebro em estado de hipertireoidismo também resulta em atividade alterada dependente do sexo (Noda et. al. 2016).

A conexão do sistema serotoninérgico (frequentemente envolvido no transtorno de depressão) e os hormônios tireoidianos, especificamente o hipotireoidismo, também foram

relatados em diversos estudos (Bauer et al. 2002; Tousson et al. 2012). Foi postulado que os hormônios da tireoide aumentam a atividade do receptor de serotonina e a resposta serotoninérgica (Gur et al. 2004; Mason et al. 1987). Além disso, o desenvolvimento do sistema monoaminérgico é retardado em roedores com hipotireoidismo (Ahmed et al. 2011). Mesmo assim, a atividade reduzida dos neurotransmissores monoaminérgicos tem sido associada à depressão (Nemeroff, 2007). Conforme Zhang et al. (2016), ratas tireoidectomizadas apresentaram atividade oposta de 5-HT nas regiões analisadas, uma vez que a habênula lateral (LHb) aumentou a atividade da 5-HT (ligada à hiperatividade) e o DRN apresentou um decréscimo nos níveis de 5-HT (ligada a comportamento tipo depressivo). A LHb demonstrou desempenhar um papel importante no início do transtorno depressivo, em que a participação de 5-HT é evidente (Yang et al. 2008; Zhao et al. 2015). Além disso, a LHb é uma região chave que inibe os níveis de 5-HT no núcleo dorsal da rafe (DRN), apresentando relação anatômica e funcional com esta estrutura (Ferraro et al. 1996). Portanto, ambas as estruturas parecem mediar o início da depressão em ratos com hipotireoidismo. A atividade serotoninérgica reduzida também foi mostrada em camundongos fêmeas com hipotireoidismo induzido farmacologicamente (Bortolotto et al. 2018). Tais decréscimos foram observados no CPF e hipocampo, assim como baixos níveis de dopamina. O estado de hipotireoidismo parece estar firmemente conectado com níveis diminuídos de 5-HT em regiões específicas do cérebro, uma vez que foram observados níveis diminuídos de 5-HT cerebral. Em contrapartida, o mesmo estudo mostrou que ratos com hipertireoidismo apresentaram níveis mais altos de 5-HT no cérebro, mas esse grupo apresentou comportamento tipo depressivo elevado em vez do grupo hipotireoidiano, que apresentou comportamento tipo-ansioso (Yu et al. 2015). No entanto, a medida do hormônio tireoidiano é do soro e, possivelmente, os níveis de hormônio tireoidiano no cérebro podem ser diferentes (como discutido anteriormente). A atividade do receptor 5-HT_{2a} e da proteína receptora no hipocampo e no PFC de ratos hipotireoideanos também foi significativamente menor do que em ratos eutireoideanos, reforçando o papel serotoninérgico no comportamento tipo depressivo em ratos hipotireoideanos (Jin et al. 2021). Finalmente, a maioria dos ensaios acima foram baseados no estudo de Hassan et al. (2013), que avaliaram os níveis de monoaminas no cérebro e tecidos periféricos de ratos Wistar com hipotireoidismo induzido por PTU. Ratos jovens (3 semanas) e adultos (18 semanas) apresentaram níveis diminuídos de 5-HT, DA e noradrenalina nos tecidos cerebrais. Tal decréscimo foi maior em ratos adultos, e esse resultado pode ser devido, dentre vários fatores, à maior permeabilidade da barreira hematoencefálica de ratos jovens, o que poderia facilitar o transporte de algumas moléculas (Hassan et al. 2013). Embora não tenham sido avaliados ambos os sexos nos artigos citados, os dados disponíveis indicam dimorfismo sexual em alguns parâmetros monoaminérgicos, como relatam Goel e Bale (2010), de que

camundongos fêmeas apresentaram maior quantidade de receptores 5-HT hipofisários. Além disso, ratos submetidos ao paradigma de estresse crônico apresentaram diminuição da atividade dopaminérgica no córtex frontal e amígdala, enquanto as fêmeas não. Ainda mais, o estresse aumentou os níveis de 5-HT e norepinefrina em mulheres, mas não em homens (Luine, 2002). Outro estudo avaliou a atividade das monoaminas em ratos de ambos os sexos expostos ao estresse precoce, e observou que machos estressados apresentaram níveis mais baixos de 5-HT e aumento do turnover de 5-HT no CPF e no hipocampo. Ratas, por sua vez, apresentaram aumento do turnover da dopamina no CPF e aumento do turnover da norepinefrina no corpo estriado, mas diminuição do turnover da dopamina no hipocampo (González-Pardo et al. 2020). Em suma, o dimorfismo sexual é relevante para a regulação das monoaminas, e, por isso, é importante incluir ambos os sexos quando o fator hormônio tireoidiano é adicionado.

Em resumo, o resultado mais relevante da análise de RNAseq é o fato de que em decorrência do estresse persistente, parece que os animais poderiam não somente desenvolver comportamento tipo depressivo, mas também tipo maníaco. Na sequência, a expressão diferencial do gene *Trh*, envolvido na função tireoidiana, direcionou a segunda fase do estudo. Assim, a função tireoidiana parece estar associada aos transtornos de depressão e ao episódio de mania, apesar deste último ser pouco estudado em relação às disfunções tireoidianas. Em nosso estudo, a principal diferença sexual observada foi comportamental, de modo que as fêmeas apresentavam comportamentos principalmente relacionados à mania, ao passo que machos expressavam comportamento tipo-depressivo em alguns testes, como no TNF. No entanto, os animais tratados com T4 e MMI apresentaram alterações em testes de ansiedade, podendo ser um sintoma adicional do comportamento tipo depressivo (depressão ansiosa). Ainda mais, os animais que apresentaram maior proporção de animais anedônicos, quando comparados aos demais grupos, sugerem que o nível elevado de FT4 está associado a comportamento tipo-depressivo, e tal teoria é embasada por estudos citados anteriormente. Assim como pacientes depressivos podem apresentar fenótipos que variam entre os indivíduos, o mesmo foi observado, de certa forma, em nosso estudo, pois a classificação comportamental de cada animal variou de acordo com a preferência de sacarose individual, ao mesmo tempo que permite aplicar o modelo do ECBRI não somente para avaliação de comportamento tipo-depressivo, aumentando as possibilidades de resultados.

Pode-se dizer que o atual estudo foi de caráter exploratório, pois os problemas no início da pesquisa não estavam totalmente definidos, como por exemplo, a distribuição dos animais entre as classificações, que foram obtidas apenas ao final do ECBRI, após cinco

semanas. Assim, pode-se dizer que a principal limitação seria o tamanho das amostras (apesar do n inicial ser 60), o qual dificultou a análise estatística. Apesar do teste de Kolgomorov-Smirnov ser menos rígido quanto à normalidade da distribuição, o mesmo foi aceito nas análises comportamentais do presente estudo, devido ao n amostral maior do que 30. Assim, foi possível a análise por ANOVA, um teste mais confiável para análise de variáveis dependentes de diversos fatores. Ainda mais, a heterogeneidade dos grupos foi o que impediu o uso do teste de Shapiro-Wilk

6. Conclusão

No entanto, apesar das limitações descritas acima, os resultados permitem ver que uma nova classificação empregada de acordo com a preferência de sacarose possibilitou avaliar todos os animais, não dependendo somente da indução do comportamento anedônico, pois como citado anteriormente, o estresse pode desencadear outros comportamentos. Tal modelo, com essa nova visão, permitiria uma análise ampla e multifatorial dos comportamentos apresentados, permitindo a translação de tais dados para a clínica. Assim como uma análise exploratória almeja realizar, os resultados obtidos permitem aperfeiçoamento dos modelos empregados, o qual inicialmente seria o aumento da amostra. Outra proposta seria a estruturação de uma escala que incluía várias das alterações comportamentais observadas após o ECBRI poderia capturar esta ampla variabilidade comportamental, como realizado na avaliação clínica de pacientes com transtornos de humor. Além disto, em um próximo estudo, seria importante colocar modelos específicos para avaliação de outros comportamentos tipo-maníaco ou tipo-depressivo, como o BPM que avalia simultaneamente a locomoção (intensidade e padrão) e exploração. Ainda mais, os modelos de disfunção tireoidiana empregados parecem não terem sido totalmente eficazes, podendo-se aplicar um modelo alternativo que induz alterações tireoidianas em menos tempo e com drogas diferentes. Outro fator importante, e indispensável, é avaliar uma avaliação mais detalhada da atividade tireoidiana (p. ex., TH e deiodinação), pois localmente esta pode ter sido modificada apesar da ausência de alterações nos níveis plasmáticos de TH.

Em resumo, nossos dados mostraram que em decorrência de estresse persistente, parece que os animais poderiam não somente desenvolver comportamento tipo depressivo, mas também tipo maníaco. O dimorfismo sexual também foi observado, de modo que machos e fêmeas responderam diferencialmente em alguns teste comportamentais e ao modelo de indução ao hipertireoidismo. Ainda mais, nossos dados demonstram que a disfunção tireoidiana pode ser um fator importante na psicopatologia dos transtornos de depressão e mania, tal como uma nova visão sobre o modelo de ECBRI é possível e

aplicável, de forma que diversas pesquisas acerca do tema possam surgir a partir deste estudo exploratório.

7. Referências Bibliográficas

- ABLER B., GREENHOUSE I., et al. Abnormal reward system activation in mania. **Neuropsychopharmacology**. 7:7, 2007.
- ABRIAL E., BÉTOURNÉ A., et al. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. **Int J Neuropsychopharmacol**.18:pyu031. E414 70. 2015.
- ABULSEOUD O., SANE N., et al. Free T4 index and clinical outcome in patients with depression. **J Affect Disord**. 100(1-3):271-7. doi: 10.1016/j.jad.2006.10.012. 2007.
- AGUILERA G., et.al. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. **Stress**. v. 10, p. 153-161. 2007.
- AHMED R.G. Perinatal TCDD exposure alters developmental neuroendocrine system. **Food Chem Toxicol**. 49(6):1276-84. doi: 10.1016/j.fct.2011.03.008. Erratum in: Food Chem Toxicol. 2014 Apr;66:386. 2011.
- AKISKAL H.S., et al. Toward a Refined Phenomenology of Mania: Combining Clinician-Assessment and Self-report in the French EPIMAN Study. **J Affect Disord**. 67;89-96, 2001.
- ALTSHULER L.L., COHEN L.S., et al. Treatment of depression in women: a summary of the expert consensus guidelines. **J Psychiatr Pract**. 7(3):185-208. doi: 10.1097/00131746-200105000-00006. 2001.
- ANAND A., CHARNEY D.S. Norepinephrine dysfunction in synapse in depression. **J Clin. Psychiatry**. v. 61, p. 16-24. 2000.
- ARMARIO A., et al. Effect of acute and chronic psychogenic stress on corticoadrenal and pituitary-thyroid hormones in male rats. **Horm Res**. 20: 241–245. 1984.
- ASHOK A.H., MARQUES T.R., et al. The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Mol Psychiatry**. May;22(5):666-679. doi: 10.1038/mp.2017.16. 2017.
- AWAD H.A., ALREFAIE Z.A.. An evidence for the transcriptional regulation of iodothyronine deiodinase 2 by progesterone in ovariectomized rats. **J Physiol Biochem**. Jun;70(2):331-9. doi: 10.1007/s13105-013-0307-y. 2014.
- BAHLS S.C., DE CARVALHO G.A.. A relação entre a função tireoidiana e a depressão: uma revisão [The relation between thyroid function and depression: a review. **Braz J Psychiatry**. Mar;26(1):41-9. Portuguese. doi: 10.1590/s1516-44462004000100012. 2004.
- BAKSI S., PRADHAN A. Thyroid hormone: sex-dependent role in nervous system regulation and disease. **Biol Sex Differ**. 12(1):25. doi: 10.1186/s13293-021-00367-2. 2021.
- BAUER M.S., et al. Rapid cycling bipolar affective disorder. Association with grade I hypothyroidism. **Archives of General Psychiatry**. vol. 47, no. 5, pp. 427– 432, 1990.
- BAUER M., GOETZ T., et al. The thyroid-brain interaction in thyroid disorders and mood disorders. **J Neuroendocrinol**. Oct;20(10):1101-14. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01774.x. 2008.
- BAUMGARTNER A., HEYNE A., et al. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in chronic alcoholism. Deiodinase activities and thyroid hormone concentrations in brain and peripheral

tissues of rats chronically exposed to ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.** Apr;18(2):295-304. doi: 10.1111/j.1530-0277.1994.tb00017.x. 1994.

BAUMGARTNER A. Thyroxine and the treatment of affective disorders: An overview of the results of basic and clinical research. **Int J Neuropsychopharmacol.** 3:149–165. 2000.

BARBAZUK W.B., EMRICH S.J., et al. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. **Plant J.** 51:910–918. 2007.

BASKIN, H.J., et al. American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Endocrine Practice.** vol. 8, no. 6, pp. 457–469, 2002.

BEKRIS S., ANTONIOU K., et al. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behav Brain Res.** Jun 3;161(1):45-59. doi: 10.1016/j.bbr.2005.01.005. 2005.

BELL C., et al. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. **Br J Psychiatry.** May;178:399-405. doi: 10.1192/bjp.178.5.399. 2001.

BENJAMIN J., et al. Genes for personality traits: implications for psychopathology. **Int J Neuropsychopharmacol.** 1:153–68. 1998.

BERENT D., ZBORALSKI K., et al. Thyroid hormones association with depression severity and clinical outcome in patients with major depressive disorder. **Mol Biol Rep.** 41(4):2419-25. doi: 10.1007/s11033-014-3097-6. 2014.

BERK M., KAPCZINSKI F., et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev.** Jan;35(3):804-17. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.001. 2011.

BERNTSON G.G., et al. Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. **Eur J Neurosci.** Oct;18(8):2103-9. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02967.x. 2003.

BERRETTA J., MORILLON A.. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. **EMBO Rep.** 10:973–982. 2009.

BERRIDGE K.C.; KRINGELBACH M.L. Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. **Current Opinion in Neurobiology.** vol.23, n.3, pp. 294–303, 2013.

BERTON O., NESTLER E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosc.** v. 7, n. 2, p. 137-151. 2006.

BHANA N., PERRY C.M. Olanzapine: a review of its use in the treatment of bipolar I disorder. **CNS Drugs.** 15;871–904,2001.

BIANCO A.C., SALVATORE D., et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev.** Feb;23(1):38-89. doi: 10.1210/edrv.23.1.0455. 2002.

BIANCO A.C. Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. **Endocrinology.** Sep;152(9):3306-11. doi: 10.1210/en.2011-1104. Epub 2011 Jun 28. 2011.

BIELAJEW C., KONKLE A.T., et al. Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. **Stress.** 6:269–280. 2003.

- BIRNEY E., et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**. 447:799–816. 2007.
- BONHOMME N., ESPOSITO E. Involvement of serotonin and dopamine the mechanism of antidepressant drugs - review. **J. Clin. Psychopharmacol.** v. 18, p. 447-454. 1998.
- BORSINI F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev.** 19:377–395. doi: 10.1016/0149-7634(94)00050-b. 1995.
- BORTOLOTTO V.C., PINHEIRO F.C., et al. Chrysin reverses the depressive-like behavior induced by hypothyroidism in female mice by regulating hippocampal serotonin and dopamine. **Eur J Pharmacol.** 5;822:78-84. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.017. 2018.
- BRAVERMAN I.E., et al. Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine in athyreotic human subjects. **J. Clin. Invest.** 49, 855-894. 1970.
- BRENT G.A. Mechanisms of thyroid hormone action. **J Clin Invest.** 122(9):3035-43. doi: 10.1172/JCI60047. 2012.
- BRENTA G., et al. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 57 (4) • June 2013. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000400003>. 2013.
- BRIGITTA B. Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. **Dialogues Clin Neurosci.** 4(1):7-20. 2002.
- BROOKE S., MCLAUGHLIN J., et al. Effect of gp120 on glutathione peroxidase activity in cortical cultures and the interaction with steroid hormones. **J. Neurochem.** 81;277–84, 2002.
- BUENO B.G., CASO J.R., LEZA, J.C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neurosc and Behav Rev.** v. 32, p. 1136-1151. 2008.
- BULANT M., ROUSSEL J.P., et al. Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (Pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH (160–169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. **Proc Natl Acad Sci USA.** 87:4439–43. 1990.
- BURAS A., BATTLE L., et al. Thyroid hormones regulate anxiety in the male mouse. **Horm Behav.** Feb;65(2):88-96. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.11.008. 2014.
- BYMASTER F.P., FELDER C.C. Role of the cholinergic muscarinic system in bipolar disorder and related mechanism of action of antipsychotic agents. **Mol. Psychiatry.** 7(1);S57–63, 2002.
- CADDY C., AMIT B.H., et al. Ketamine and other glutamate receptor modulators for depression in adults. **Cochrane Database Syst Rev.** doi:10.1002/14651858.CD011612.pub2. 2015..
- CAMPOS J.A., DEITOS T.F., et al. Use of sleep questionnaires in assessing the effect of moclobemide on the sleep profiles of depressive patients. **Clin Neuropharmacol.** 17 Suppl 1:S19-28. doi: 10.1097/00002826-199417001-00004. 1994.
- CARLSSON A., WATERS N., et al. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 41:237-60. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.237. 2001.

CASAROTTO, P. C.; ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 11, p. 735-742. 2007.

CASPI A., MOFFITT T.E. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. **Nat Rev Neurosci.** Jul;7(7):583-90. doi: 10.1038/nrn1925. 2006.

CASSIDY F., et al. Thyroid function in mixed and pure manic episodes. **Bipolar Disord.** Dec;4(6):393-7. doi: 10.1034/j.1399-5618.2002.01214.x. 2002.

CASTRÉN E. Neuronal network plasticity and recovery from depression. **JAMA Psychiatry.** 70(9), 983-989. 2002.

CHAKRABARTI S. Thyroid functions and bipolar affective disorder. **J Thyroid Res.** 2011:306367. 2011.

CHANG K.D., KECK P.E. Jr. Differences in thyroid function between bipolar manic and mixed states. **Biol Psychiatry.** May 15;43(10):730-3. doi: 10.1016/s0006-3223(98)80003-6. 1998.

CHANG C.M., et al. Evidence for the benefits of nonantipsychotic pharmacological augmentation in the treatment of depression. **CNS Drugs.** 27 Suppl 1:S21-7. doi: 10.1007/s40263-012-0030-1. 2013.

CHOPRA, I. J.; et al. Serum thyrotropin in hospitalized psychiatric patients: evidence for hyperthyrotropinemia as measured by an ultrasensitive thyrotropin assay. **Metabolism.** vol. 39, no. 5, pp. 538–543. 1990.

CIZZA G., BRADY L., et al. Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic-pituitary-thyroidal function in Fisher 344/N rats. **Neuroendocrinology.** 64: 440–448. 1996.

CLARK L., et al. A neuropsychological investigation of prefrontal cortex involvement in acute mania. **Am J Psychiatry.** 158;1605–11, 2001.

CLARKE S.N., OSSENKOPP K.P. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. **Am J Physiol.** Mar;274(3):R718-24. doi: 10.1152/ajpregu.1998.274.3.R718. 1998.

CLOONAN N., et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods.** 5:613–619. 2008.

da CONCEIÇÃO R.R., LAUREANO-MELO R., et al. Antidepressant behavior in thyroidectomized Wistar rats is induced by hippocampal hypothyroidism. **Physiol Behav.** 157:158-64. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.02.005. 2016.

COOPER D.S. Antithyroid drugs for the treatment of hyperthyroidism caused by Graves' disease. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 27:225-47. 1998.

COOPER-KAZAZ R., LERER B. Efficacy and safety of triiodothyronine supplementation in patients with major depressive disorder treated with specific serotonin reuptake inhibitors. **Int J Neuropsychopharmacol.** 11(5):685–99. 2008.

CORRIGER A., PICKERING G. Ketamine and depression: a narrative review. **Drug Des Devel Ther.** Aug 27;13:3051-3067. doi: 10.2147/DDDT.S221437. 2019.

CRYAN J.F., MARKOU A., LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.** 23;238-45, 2002.

CRYAN J.F., SWEENEY F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **Br J Pharmacol.** v. 164, p. 1129-1161. 2011.

CULPEPPER L. Understanding the Burden of Depression. **J Clin Psychiatry.** 72(6):e19. 2011.

CUNHA A.B., FREY B.N. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. **Neurosci Lett.** 398(3);215-9, 2006.

DABAN C., VIETA E., et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. **Psychiatr Clin North Am.** Jun;28(2):469-80. doi: 10.1016/j.psc.2005.01.005. 2005.

DALLA C., ANTONIOU K., et al. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? **Neuroscience.** 135:703–714. 2005.

DALLA C., ANTONIOU K., et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiol Behav.** Feb 27;93(3):595-605. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.10.020. 2008.

DALLA C., PITYCHOUTIS P.M., et al. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 106(3):226-33. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00516.x. 2010.

DALLA C., PITYCHOUTIS P.M., et al. Sex differences in response to stress and expression of depressive-like behaviours in the rat. **Curr Top Behav Neurosci.** 8:97–118. 2011.

DEAN J., KESHAVAN M. The neurobiology of depression: An integrated view. **Asian J Psychiatr.** Jun;27:101-111. doi: 10.1016/j.ajp.2017.01.025. 2017.

DELITALA A.P., TERRACCIANO A., et al. Depressive symptoms, thyroid hormone and autoimmunity in a population-based cohort from Sardinia. **J Affect Disord.** 191:82-7. doi: 10.1016/j.jad.2015.11.019. 2016.

DENT C.L., ISLES A.R. An overview of measuring impulsive behavior in mice. **Curr Protoc Mouse Biol.** Jun 16;4(2):35-45. doi: 10.1002/9780470942390.mo140015. 2014.

DIXON J.F., HOKIN L.E. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95;8363–8.1998.

DRUGAN R.C., MORROW A.L., et al. Stress-induced behavioral depression in the rat is associated with a decrease in GABA receptor-mediated chloride ion flux and brain benzodiazepine receptor occupancy. **Brain Res.** 487:45–51. 1989.

DSM-V **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edn.** American Psychiatric Association: Washington, DC. 2012.

DUMAN R.S., AGHAJANIAN G.K., et al. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nat Med.** 22(3):238-49. doi: 10.1038/nm.4050. 2016.

DUNTAS L.H., MAILLIS A. Hypothyroidism and depression: salient aspects of pathogenesis and management. **Minerva Endocrinol.** 38(4):365-77. 2013.

DUTTA S.D., PATEL D.K., et al. Effects of GABA/β-glucan supplements on melatonin and serotonin content extracted from natural resources. **PLoS One**. 16(3):e0247890. doi: 10.1371/journal.pone.0247890. 2021.

ENGBRING N.M., ENGSTRÖM W.W. Effects of estrogens and testosterone on circulating thyroid hormone. **J Clin Endocrinol Metab**. 19:783–96. 1958.

ENGELS K., RAKOV H., et al. Differences in Mouse Hepatic Thyroid Hormone Transporter Expression with Age and Hyperthyroidism. **Eur Thyroid J**. Sep;4(Suppl 1):81-6. doi: 10.1159/000381020. 2015.

ESER D., SCHÜLE C., et al. Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids in depression and anxiety disorders. **Psychopharmacology (Berl)**. 186(3):373-87. doi: 10.1007/s00213-005-0188-z. Epub 2005 Oct 25. PMID: 16247651. 2006.

EVERSON C.A., NOWAK T.S. Jr. Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone mRNA responses to hypothyroxinemia induced by sleep deprivation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. Jul;283(1):E85-93. doi: 10.1152/ajpendo.00558.2001. 2002.

FINAN P.H., SMITH M.T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: Dopamine as a putative mechanism. **Sleep Medicine Rev**. v. 30, p. 1-11. 2012.

FRANKLYN J.A., et al. The influence of age and sex on tests of thyroid function. **Ann Clin Biochem**. 22:502–5. 1985.

GHADRDOOST B., VAFAEI A.A., et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. **Eur J Pharmacol**. Sep 30;667(1-3):222-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.012. 2011.

GLOWINSKI J., AXELROD J. Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramina and structurally related compounds. **Nature**. v. 204, p. 1318-1319. 1964.

GOEL N., BALE T.L. Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis. **Endocrinology**. 151(4):1784-94. doi: 10.1210/en.2009-1180. 2010.

GOLD P.W., CHROUSOS G.P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Molecular Psychiatry**. vol.7, n. 3, pp. 254–275. 2002.

GOLD, P.W. The neurobiology of stress and its relevance to psychotherapy. **Clinical Neuroscience Research**. vol. 4, n. 5-6, pp. 315–324. 2005.

GOLD P.W., et al. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. **Neural Plast**. 2015:581976. doi: 10.1155/2015/581976. 2015.

GONZÁLEZ-PARDO H., ARIAS J.L., et al. Sex-Specific Effects of Early Life Stress on Brain Mitochondrial Function, Monoamine Levels and Neuroinflammation. **Brain Sci**. Jul 14;10(7):447. doi: 10.3390/brainsci10070447. PMID: 32674298; PMCID: PMC7408325.

GOODWIN F.K., PRANGE A.J. Jr, et al. Potentiation of antidepressant effects by L-triiodothyronine in tricyclic nonresponders. **Am J Psychiatry**. 139(1):34-8. doi: 10.1176/ajp.139.1.34. 1982.

GRONLI J., et al. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. **Behav Brain Res.** v. 181, p. 42-51. 2007.

GUR E., LIFSCHYTZ T., et al. Effects of triiodothyronine on 5-HT(1A) and 5-HT(1B) autoreceptor activity, and postsynaptic 5-HT(1A) receptor activity, in rat hypothalamus: lack of interaction with imipramine. **Psychoneuroendocrinology.** 29(9):1172-83. doi: 10.1016/j.psyneuen.2004.01.011. 2004.

FALLAH E., ARMAN S., et al. Effect of Tamoxifen and Lithium on Treatment of Acute Mania Symptoms in Children and Adolescents. **Iran J Child Neurol.** Spring;10(2):16-25. 2016.

FEKETE C., LÉGRÁDI G., et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. **J Neurosci.** Feb 15;20(4):1550-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-04-01550.2000. 2000.

FERRARO L., TANGANELLI S., et al. The vigilance promoting drug modafinil decreases GABA release in the medial preoptic area and in the posterior hypothalamus of the awake rat: possible involvement of the serotonergic 5-HT₃ receptor. **Neurosci Lett.** 6;220(1):5-8. doi: 10.1016/s0304-3940(96)13212-2. 1996.

FLAISHER-GRINBERG S., et al. Attenuation of high sweet solution preference by mood stabilizers: A possible mouse model for the increased reward-seeking domain of mania. **Journal of Neuroscience Methods.** 177:44–50. 2009.

FLYNN R.W., MACDONALD T.M., et al. The thyroid epidemiology, audit, and research study: thyroid dysfunction in the general population. **J Clin Endocrinol Metab.** 89(8):3879-84. doi: 10.1210/jc.2003-032089. 2004.

FORMAN-HOFFMAN V., PHILIBERT R.A. Lower TSH and higher T4 levels are associated with current depressive syndrome in young adults. **Acta Psychiatr Scand.** 114(2):132-9. doi: 10.1111/j.1600-0447.2005.00703.x. 2006.

FOSTER J.A., NEUFELD K.A.M. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends Neurosci.** 36(5):305-12. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005. 2013.

HAGE M.P., AZAR S.T. The Link between Thyroid Function and Depression. **J Thyroid Res.** 2012:590648. doi: 10.1155/2012/590648. 2012.

HAHN C.G., FRIEDMAN E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. **Bipolar Disord.** 1:81-6. 67. 1999.

HAJNAL A., NORGREN R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. **Brain Res.** 904:76–81. 2001.

HAJNAL A., et al. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 286:R31–7. 2004.

HAJNAL A., NORGREN R. Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by rapid sucrose. **Physiol Behav.** 84:363–9. 2005.

HASHIMOTO K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective. **Psychiatry Clin Neurosci.** Oct;73(10):613-627. doi: 10.1111/pcn.12902. Epub 2019 Jul 11. 2019.

HASLER G., DREVETS W.C., et al. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**. 29(10):1765-1781. 2004.

HASLER G., DREVETS W.C., et al. Toward constructing an endophenotype strategy for bipolar disorders. **Biol Psychiatry**. 60:93–105. 2006.

HASSAN W.A., ALY M.S., et al. Impact of experimental hypothyroidism on monoamines level in discrete brain regions and other peripheral tissues of young and adult male rats. **Int J Dev Neurosci**. 31(4):225-33. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.02.001. 2013.

HELMREICH D.L., PARFITT D.B., et al. Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. **Neuroendocrinology**. 81(3):183-92. doi: 10.1159/000087001. 2005.

HENDRICK V., et al. Psychoneuroendocrinology of mood disorders: the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Psychiatric Clinics of North America**. Vol 21, Issue 2. 277-292. 1998.

HEINRICH T.W., GRAHM G. Hypothyroidism Presenting as Psychosis: Myxedema Madness Revisited. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**. Dec;5(6):260-266. doi: 10.4088/pcc.v05n0603. 2003.

HENN F.A., VOLLMAYR B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? **Biol. Psychiatry**. v. 56, p. 146-150. 2004.

HERNANDEZ A., QUIGNODON L., et al. Type 3 deiodinase deficiency causes spatial and temporal alterations in brain T3 signaling that are dissociated from serum thyroid hormone levels. **Endocrinology**. Nov;151(11):5550-8. doi: 10.1210/en.2010-0450. Epub 2010 Aug 18. 2010.

HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ F., et al. GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Rev Neurosci**. 30(3):289-303. doi: 10.1515/revneuro-2018-0014. 2019.

HIGUCHI F., UCHIDA S., et al. Hippocampal MicroRNA-124 Enhances Chronic Stress Resilience in Mice. **J Neurosci**. Jul 6;36(27):7253-67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0319-16.2016. 2016.

HIRSCHFELD R.M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J. Clin. Psychiatry**. v. 61, n. 6, p. 4-6. 2000.

JACKSON I M.D. The thyroid axis and depression. **Thyroid**. vol. 8, n.10, pp. 951–956. 1998.

JACKSON I.M.D., LUO L.G. Antidepressants inhibit the glucocorticoid stimulation of thyrotropin releasing hormone expression in cultured hypothalamic neurons. **Journal of Investigative Medicine**. vol. 46, n.9, pp. 470–474. 1998.

JIN Z., LING J., et al. Serotonin 2A receptor function and depression-like behavior in rats model of hypothyroidism. **Exp Brain Res**. 239(8):2435-2444. doi: 10.1007/s00221-021-06129-1. 2021.

JOELS M., KARST H., et.al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**. 7;221–31, 2004.

JOFFE R.T., YOUNG L.T., et al. The thyroid and mixed affective states. **Acta Psychiatr Scand.** Aug;90(2):131-2. doi: 10.1111/j.1600-0447.1994.tb01568.x. 1994.

JOFFE R., et al. Changes in thyroid hormone levels following response to cognitive therapy for major depression. **Am J Psychiatry.** 153: 411–413. 1996.

JOHNSON S.L. Mania and dysregulation in goal pursuit: a review. **Clin Psychol Rev.** 25:241–62. 2005.

JURUENA M.F., et al. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 26, n. 3, p. 189-201. 2004.

KAMBLE M.T., NANDEDKAR P.D., et al. Thyroid function and mental disorders: an insight into the complex interaction. **J Clin Diagn Res.** 7(1):11-4. doi: 10.7860/JCDR/2012/4861.2656. 2013.

KAPRANOV P., et al. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. **Nature Rev. Genet.** 8:413–423. 2007.

KENDLER K.S., NEALE M.C., et al. Childhood parental loss and adult psychopathology in women: a twin study perspective. **Archives of General Psychiatry.** vol. 49, n.2, pp.109–116. 1992.

KENDLER K.S., KESSLER R.C., et al. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **The American Journal of Psychiatry.** vol.152, n.6, pp. 833–842. 1995.

KENDLER K.S., GARDNER C.O. Sex differences in the pathways to major depression: a study of opposite-sex twin pairs. **Am J Psychiatry.** Apr;171(4):426-35. doi: 10.1176/appi.ajp.2013.13101375. 2014.

KESSLER R.C. Epidemiology of women and depression. **J Affect Disord.** 74(1):5-13. doi: 10.1016/s0165-0327(02)00426-3. 2003.

KHAYACHI A., ASE A., et al. Chronic lithium treatment alters the excitatory/ inhibitory balance of synaptic networks and reduces mGluR5-PKC signalling in mouse cortical neurons. **J Psychiatry Neurosci.** Jun 2;46(3):E402-E414. doi: 10.1503/jpn.200185. 2021.

KIM E.Y., KIM S.H., et al. Relationship between thyroid-stimulating hormone levels and risk of depression among the general population with normal free T4 levels. **Psychoneuroendocrinology.** 58:114-9. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.04.016. 2015.

KIOUKIA-FOUGIA N., ANTONIOU K., et al. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** Jun;26(5):823-30. doi: 10.1016/s0278-5846(01)00297-4. PMID: 12369253. 2002.

KIRKEGAARD C., BJØRUM N., et al. Thyrotrophin-Releasing Hormone (TRH) Stimulation Test in Manic-Depressive Illness. **Arch Gen Psychiatry.** 35(8):1017–1021. doi:10.1001/archpsyc.1978.01770320111011. 1978.

KIRKEGAARD C., et al. Increased production of thyroxine and inappropriately elevated serum thyrotropin in levels in endogenous depression. **Biological Psychiatry.** vol.27, n.5, pp.472–476. 1990.

KLEIN L.C., CORWIN E.J. Seeing the unexpected: how sex differences in stress responses may provide a new perspective on the manifestation of psychiatric disorders. **Curr Psychiatry Rep.** 4(6):441-8. doi: 10.1007/s11920-002-0072-z. 2002.

KONDO T., WATARAI Y., et al. T cell-dependent acceleration of chemoattractant cytokine gene expression during secondary rejection of allogeneic skin grafts. **Transplantation.** Mar 15;63(5):732-42. doi: 10.1097/00007890-199703150-00021. 1997.

KONKLE A.T., BAKER S.L., et al. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. **Brain Res.** Dec 5;992(2):227-38. doi: 10.1016/j.brainres.2003.08.047. 2003.

KRAEUTER A.K., et al. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Methods Mol Biol.** 1916:69-74. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_4. 2019.

KUBERA M., MAES M., et.al. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subject to the chronic mild stress model of depression. **J. Affec Disord.** 63;171-8. 2001.

KUBERA M., KENIS G., et.al. Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. **International Immunopharmacol.** 4;185-92. 2004.

KULIKOV A., et al. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. **Neurosci Lett.** 234(2-3):111-4. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00664-2. 1997.

KUMAR A., GARG R., et.al. Nitric oxide mechanism in protective effect of imipramine and venlafaxine against acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **Neurosc Lett.** 467;72-5. 2009.

LANGER P., VIGAS M., et al. Immediate increase of thyroid hormone release during acute stress in rats: effect of biogenic amines rather than that of TSH? **Acta Endocrinol (Copenh).** Dec;104(4):443-9. doi: 10.1530/acta.0.1040443. 1983.

LAVIOLA G., MACRI S., et al. Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 27:19-31. 2003.

LAZAR M. Thyroid hormone receptors: Multiple forms, multiple possibilities. **Endocr Rev.** 14: 184-193. 1993.

LECHAN R.M., WU P., et al. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. **Science.** 231:159-161. 1986.

LECHAN R.M., KAKUCSKA I. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Ciba Found Symp.** 168:144-58; discussion 158-64. doi: 10.1002/9780470514283.ch10. 1992.

LEE C.S., HUTTO B. Recognizing thyrotoxicosis in a patient with bipolar mania: a case report. **Ann Gen Psychiatry.** 7:3. 2008.

LEE H.H., CHANG C.H., et al. The correlation between longitudinal changes in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis activity and changes in neurocognitive function in mixed-state bipolar II disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat.** Oct 15;14:2703-2713. doi: 10.2147/NDT.S173616. 2018.

LI Y., et.al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron.** v. 59, p. 399-412. 2008.

LIU M.Y., YIN C.Y. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nat Protoc.** Jul;13(7):1686-1698. doi: 10.1038/s41596-018-0011-z. 2018.

LIANG N., et al. Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 291:R1236–9. 2006.

LIFSCHYTZ T., SEGMAN R., et al. Basic mechanisms of augmentation of antidepressant effects with thyroid hormone. **Curr Drug Targets.** 7(2):203-10. doi: 10.2174/138945006775515482. 2006.

van LOO H.M., AGGEN S.H., et al. Sex similarities and differences in risk factors for recurrence of major depression. **Psychol Med.** Jul;48(10):1685-1693. doi: 10.1017/S0033291717003178. 2018.

LUINE V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. **Stress.** 5(3):205-16. doi: 10.1080/1025389021000010549. 2002.

LUSCHER B., et al. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Mol Psychiatry.** Apr;16(4):383-406. doi: 10.1038/mp.2010.120. 2011.

LUSCHER B., FUCHS T. GABAergic control of depression-related brain states. **Adv Pharmacol.** 73:97-144. doi: 10.1016/bs.apha.2014.11.003. 2015.

MACIEJEWSKI P.K., et al. Sex differences in event-related risk for major depression. **Psychol Med.** May;31(4):593-604. doi: 10.1017/s0033291701003877. 2001.

MAIER S.F., WATKINS L.R. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. **Psychol. Rev.** v. 105, n. 1, p. 83-107. 1998.

MARIONI J., MASON C., et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Res.** (doi: 10.1101/gr.079558.108). 2008.

MARKOVA N., CHERNOPIATKO A., et al. Hippocampal gene expression of deiodinases 2 and 3 and effects of 3,5-diiodo-L-thyronine T2 in mouse depression paradigms. **Biomed Res Int.** 2013:565218. doi: 10.1155/2013/565218. 2013.

MARTÍ O., GAVALDÀ A., et al. Acute stress attenuates but does not abolish circadian rhythmicity of serum thyrotrophin and growth hormone in the rat. **Eur J Endocrinol.** Dec;135(6):703-8. doi: 10.1530/eje.0.1350703. 1996.

MASON G.A., BONDY S.C., et al. The effects of thyroid state on beta-adrenergic and serotonergic receptors in rat brain. **Psychoneuroendocrinology.** 12(4):261-70. doi: 10.1016/0306-4530(87)90050-3. 1987.

MATTHEWS K., et al. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. **Physiology & Behavior.** 57(2):241-248. 1995.

MCARTHUR R., BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav.** 84:436–52. 2006.

MCGONAGLE K.A., KESSLER R.C. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. **Am J Community Psychol.** Oct;18(5):681-706. doi: 10.1007/BF00931237. 1990.

MCKINNEY W.T., BUNNEY W.E. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Arch Gen Psychiatry**. v. 21, p. 240-248. 1969.

MÉNARD C., et al. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. **Neuroscience**. 321:138-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.053. 2016.

MILLER A.H., et al. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**. 65(9):732-41. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029. 2009.

MILLER O.H., YANG L., et al. GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. **eLife**. 3:e03581. doi:10.7554/eLife.03581. 2014.

MITSUSHIMA D., YAMADA K., et al. Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. **Eur J Neurosci**. Dec;24(11):3245-54. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05214.x. 2006.

MONJE F.J., CABATIC M., et al. Constant Darkness Induces IL-6-Dependent Depression-Like Behavior through the NF- κ B Signaling Pathway. **J Neurosci**. 31(25):9075–83, 2011.

MONLEON S.D., AQUILA P., et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. **Psychopharmacol**. 117:435-57, 1995.

MOREAU J.L., JENCK F., et al. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT_{1C} receptor activation in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. 110:140–144. 1993.

MORENO R.A., et al. Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. **Rev Psiquiatr Clín**. 32(1);S39-48, 2005.

MORIN R., et al. Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. **Biotechniques**. 45:81–94. 2008.

MORLEY J. Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. **Endocr Rev**. 2: 396–436. 1981.

NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**. v. 4, n. 1, p. 336. 1996.

NEMEROFF, C.B. New directions in the development of antidepressants: the interface of neurobiology and psychiatry. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**. v. 17, p. 13–16. 2002.

NEMEROFF C.B., MAYBERG H.S., et al. VNS therapy in treatment-resistant depression: clinical evidence and putative neurobiological mechanisms. **Neuropsychopharmacology**. Jul;31(7):1345-55. doi: 10.1038/sj.npp.1301082. 2006.

NEMEROFF C.B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry**. 68 Suppl 8:17-25. 2007.

NESTLER E.J., et al. Preclinical models: Status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**. 52(6);503-28. 2002.

NESTLER E.J., CARLEZON Jr. W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**. 59(12);1151-9. 2006.

NESTLER E.J., HYMAN S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci.** Oct;13(10):1161-9. doi: 10.1038/nn.2647. 2010.

NG W.X., LAU I.Y., et al. Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: a review and synthesis. **Neurosci Biobehav Rev.** 33:336-54. 2009.

NIYAMA T., KUROIWA M., et al. Sex Differences in Dendritic Spine Formation in the Hippocampus and Animal Behaviors in a Mouse Model of Hyperthyroidism. **Front Cell Neurosci.** 14:268. doi: 10.3389/fncel.2020.00268. 2020.

NODA M. Thyroid Hormone in the CNS: Contribution of Neuron-Glia Interaction. **Vitam Horm.** 106:313-331. doi: 10.1016/bs.vh.2017.05.005. 2018.

NOLAN L.A., et al. Permissive effects of thyroid hormones on rat anterior pituitary mitotic activity. **J Endocrinol.** Jan;180(1):35-43. doi: 10.1677/joe.0.1800035. 2004.

O'BRIEN S.M., SCULLY P., et al. Plasma cytokines profiles in depressed patients who fail to respond to selective serotonin reuptake inhibitors therapy. **J. Psychiatr. Res.** 41(3-4);326-31. 2007.

OLIVARES E.L., SILVA-ALMEIDA C., et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology.** 62(1):446-56. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.035. 2012.

ONGÜR D., JENSEN J.E., et al. Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glial interactions in acute mania. **Biol Psychiatry.** 64:718-26. 2008.

ORTIGA-CARVALHO T.M., et al. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. **Nat RevEndocrinol.** 10: 582-591. 2014.

ORTIGA-CARVALHO T.M., CHIAMOLERA, M.I., et al. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Comprehensive Physiology.** Vol 6, Issue 3. 2016.

OWENS M.J., NEMEROFF C.B. The role of HLC in the pathophysiology of affective disorders. **Laboratory and Clinical Studies.** v. 172. 1993.

OYOLA M.G., HANDA R.J. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. **Stress.** Sep;20(5):476-494. doi: 10.1080/10253890.2017.1369523. 2017.

OZSOLAK F., MILOS P.M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nat Rev Genet.** Feb;12(2):87-98. doi: 10.1038/nrg2934. Epub 2010 Dec 30. 2011.

PALMA B.D., TIBA P.A., et al. Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor. **Braz J Psychiatry.** May;29 Suppl 1:S33-8. Portuguese. doi: 10.1590/s1516-44462007000500007. 2007.

PATKI G., SOLANKI N., et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Res.** Nov 20;1539:73-86. doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.033. 2013.

PEET M., PETERS S. Drug-induced mania. **Drug Safety.** 12;146-53. 1995.

PEETERS R., FEKETE C., et al. Regional physiological adaptation of the central nervous system deiodinases to iodine deficiency. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** Jul;281(1):E54-61. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.1.E54. 2001.

PEKARY A.E., et al. Electroconvulsive seizures increase levels of Ps4, the TRH-enhancing peptide [Prepro-TRH(160–169)], in rat brain. **Neuroendocrinology.** 65:377–84. 1997.

PEKARY A.E., SATTIN A. Regulation of TRH and TRH-related peptides in rat brain by thyroid and steroid hormones. **Peptides.** Jul;22(7):1161-73. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00429-6. 2001.

PENNER-GOEKE S., BINDER E.B. Epigenetics and depression^[P]_[SEP]. **Dialogues Clin Neurosci.** 21(4):397-405. doi: 10.31887/DCNS.2019.21.4/ebinder. 2019.

PEREIRA M., et al. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 35, n. 7, v. 1636-1644. 2011.

PERRY W., MINASSIAN A., et al. A reverse-translational study of dysfunctional exploration in psychiatric disorders: from mice to men. **Arch Gen Psychiatry.** 66, 1072-1080. 2009.

PILHATSCH M., WINTER C., et al. Increased depressive behaviour in mice harboring the mutant thyroid hormone receptor alpha 1. **Behav Brain Res.** 214(2):187-92. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.016. 2010.

PITYCHOUTIS P.M., PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z. Of depression and immunity: does sex matter? **Int J Neuropsychopharmacol.** 13:675–689. 2010.

PIZZAGALLI D.A., HOLMES A.J., et al. Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. **The American Journal of Psychiatry.** vol. 166, no. 6, pp. 702–710. 2009.

PLAGGE A., ISLES, A.R., et al. Imprinted nesp55 influences behavioral reactivity to novel environments. **Mol. Cell. Biol.** 25:3019-3026. 2005.

PONTIKIDES N., KRASSAS G.E. Basic endocrine products of adipose tissue in states of thyroid dysfunction. **Thyroid.** 17(5):421-31. doi: 10.1089/thy.2007.0016. 2007.

PRANGE A.J. Jr, WILSON I.C., et al. Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone. **Am J Psychiatry.** 126(4):457-69. doi: 10.1176/ajp.126.4.457. 1969.

PRICE J.L., DREVETS W.C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders, **Trends in Cognitive Sciences.** vol.16, n.1, pp.61–71. 2012.

PUYMIRAT J. Thyroid receptors in the rat brain. **Prog Neurobiol.** 39: 281–294. 1992.

RAKOV H., ENGELS K., et al. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. **Biol Sex Differ.** 7(1):36. doi: 10.1186/s13293-016-0089-3. 2016.

RAMPELLO L., et al. Dopaminergic hypothesis for retarded depression: a symptom profile for predicting therapeutical response. **Acta Psychiatr. Scand.** v. 84, p. 552-554. 1991.

RAO M.G., ROHILLA J., et al. Hyperthyroidism presenting as mixed affective state: a case report. **Gen Hosp Psychiatry.** 34(6):703.e13-4. doi: 10.1016/j.genhosppsy.2012.03.008. 2012.

RAUPP IM., SERENIKI A., et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with Erythrina velutina extract in the elevated plus-maze test. **J Ethnopharmacol.** 118(2);295-9. 2008.

REDEI E., et al. Corticotropin release-inhibiting factor is preprothyrotropin-releasing hormone-(178–199). **Endocrinology.** 136:3557–63. 1995.

REDEI E.E., SOLBERG L.C., et al. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. **Neuropsychopharmacology.** 24(6):632-9. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00229-3. 2001.

REGIER D.A., et al. Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders. **Br. J. Psychiatry.** 173;24–8. 1998.

RICHELSON E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clin Proc.** 76(5):511-27. doi: 10.4065/76.5.511. 2001.

RIZVI I., ANSARI N.A., et al. Widespread intracranial calcification, seizures and extrapyramidal manifestations in a case of hypoparathyroidism. **N. Am. J. Med. Sci.** 4, 369–372. 2012.

ROBBINS J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: **Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text.** (Braverman, L. E., Utiger, R. D., eds) Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996.

ROSS S. B., RENYI A.L. Inhibition of uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue. **European J of Pharmacol.** v. 7, p. 270-277. 1969.

ROSS D.S., BURCH H.B., et al. American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. **Thyroid.** 26(10):1343-1421. doi: 10.1089/thy.2016.0229. Erratum in: *Thyroid.* Nov;27(11):1462. 2016.

SAARELAINEN T., et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **J Neurosci.** v. 23, p. 349-357. 2003.

SAIRANEN M., et al. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. **J Neurosci.** v. 25, p. 1089-1094. 2005.

SALVATORE D., DAVIES T.F., et al. Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. In: Melmed S, Polonsky K, Larsen PR, Kronenberg H, editors. **Williams Textbook of Endocrinology.** (12th ed). Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 327. 2011.

SAPOLSKY R. M. Why stress is bad for your brain. **Science.** v. 5276, n. 273, p. 749-750. 1996.

SCANLON M. Endocrine functions of the hypothalamus and alterations in neuroendocrine function – focus on thyrotropin and growth hormone. **Prog Brain Res.** 93: 19–30. 1992.

SCHILDKRAUT J.J., et al. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. **J Psychiatr Res.** v. 3, p. 213-228. 1965.

SCHREIBER G., RICHARDSON S. J. The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin. **Comp. Biochem. Physiol.** 116B, 137-160. 1997.

SELYE H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **J Allergy**. Nov;17(6):231; 289; 358. 1946.

SERVATIUS R.J., NATELSON B.H., et al. Persistent neuroendocrine changes in multiple hormonal axes after a single or repeated stressor exposures. **Stress**. Nov;3(4):263-74. doi: 10.3109/10253890009001132. 2000.

SHIRAYAMA Y., et.al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci**. v. 22, p. 3251-3261. 2002.

SILVA J.E., LARSEN P.R. Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. **J Clin Invest**. Apr;77(4):1214-23. doi: 10.1172/JCI112424. 1986.

SILVER L.M. Laboratory Mice, Oxford University Press. New York. 1995.

SKALISZ L.L., BEIJAMINI V., ANDREATINI R. Effect of Hypericum perforatum on marble-burying by mice. **Phytother. Res**. 18(5);399-402. 2004.

SMITH G., SMITH J. The inhibitory potency of SCH 23390 and raclopride on licking for sucrose increases across brief-access tests. **Physiol Behav**. 101:315–9. 2010.

SOLOMON M.B., HERMAN J.P. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. **Physiol Behav**. 97(2):250-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.02.033. 2009.

STREETMAN D.D., KHANDERIA U. Diagnosis and treatment of Graves disease. **Ann. Pharmacother**. 37, 1100–1109. 2003.

STEPHEN E., et al. The Symptoms, Neurobiology and current pharmacological treatment of depression. **J. Neurosc Nur**. v. 37, n. 2, p. 102-107. 2005.

SUGRUE M.L., VELLA K.R., et al. Thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo. **Endocrinology**. 151(2):793801. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0976>. 2010.

SULLIVAN G.M., et al. Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients. **American Journal of Psychiatry**. vol.156, n.5, pp.710–715. 1999.

SULTZER D.L., CUMMINGS J.L. Drug-induced mania—causative agents, clinical characteristics and management. A retrospective analysis of the literature. **Med. Toxicol. Adverse Drug Exp**. 4;127–43. 1989.

SURÍS A., NORTH C., et al. Effects of exogenous glucocorticoid on combat-related PTSD symptoms. **Ann Clin Psychiatry**. Nov;22(4):274-9. 2010.

SWANN A.C., KOSLOW S.H., et al. Lithium carbonate treatment of mania. Cerebrospinal fluid and urinary monoamine metabolites and treatment outcome. **Arch Gen Psychiatry**. Apr;44(4):345-54. doi: 10.1001/archpsyc.1987.01800160057008. 1987.

SWANN A.C., SECUNDA S.K., et al. Mania: sympathoadrenal function and clinical state. **Psychiatry Res**. 37(2):195-205. doi: 10.1016/0165-1781(91)90075-z. 1991.

SWANN A.C. Impulsivity in mania. **Curr. Psychiatry Rep**. 11:481-487. 2009.

SZABO S. The creative and productive life of Hans Selye: a review of his major scientific discoveries. **Experientia**. v. 41, p. 564-567. 1985.

SZABO S.T., MACHADO-VIEIRA R., et al. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of Mania. **Neuropharmacology**. 56:47-55. 2009.

TANG W., CORY B., et al. The mood stabilizer lithium slows down synaptic vesicle cycling at glutamatergic synapses. **bioRxiv**.780866. 2019.

TAUROG A., DORRIS M. A reexamination of the proposed inactivation of thyroid peroxidase in the rat thyroid by propylthiouracil. **Endocrinology**.124:3030-38. 1989.

TOUSSON E., IBRAHIM W., et al. Monoamine concentrations changes in the PTU-induced hypothyroid rat brain and the ameliorating role of folic acid. **Hum Exp Toxicol**. 31(3):282-9. doi: 10.1177/0960327111405863. 2012.

TRAINOR B.C. Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences. **Horm Behav**. 60(5):457-69. doi: 10.1016/j.yhbeh.2011.08.013. 2011.

TREADWAY M.T., ZALD D.H. Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 35, p. 537-555. 2011.

TSIGOS C., CHROUSOS G.P. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress. **J Psychosom Res**. v. 53, p. 865-871. 2002.

TSURU J., ISHITOBI Y., et al. The thyrotropin-releasing hormone test may predict recurrence of clinical depression within ten years after discharge. **Neuro Endocrinol Lett**. 34(5):409-17. 2013.

TURAKULOV Y., BURIKHANOV R., et al. Influence of immobilisation stress on the levels of thyroid hormones. **Neurosci Behav Physiol**. 24: 462–464. 1994.

TYERYAR K.R., UNDE A.S. Tandem regulation of phosphoinositide signaling and acute behavioral effects induced by antidepressant agents in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. 193(2):271-82. doi: 10.1007/s00213-007-0784-1. 2007.

UHER R., MCGUFFIN P. The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the etiology of depression: 2009 update. **Mol Psychiatry**. 15(1):18-22. doi: 10.1038/mp.2009.123. 2010.

VAN HAASTEREN G., LINKELS E., et al. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotropin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. **J Endocrinol**. 145: 143–153. 1995.

VER HOEVE E.S., KELLY G., et al. Short-term and long-term effects of repeated social defeat during adolescence or adulthood in female rats. **Neuroscience**. 26;249:63-73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.073. 2013.

WALLACE D.L., HAN M., et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nat Neurosci**. 12(2):200–209. 2009.

WANG Q., TIMBERLAKE M.A. 2nd, et al. The recent progress in animal models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 3;77:99-109. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.008. 2017.

WARDEN M.R., SELIMBEYOGLU A., et al. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. **Nature**. 492, 428–432. 2012.

WEISER M.J., HANDA R.J. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. **Neuroscience**. 159:883–895. 2009.

WILLNER P., TOWELL A., et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**. 93(3):358-64. doi: 10.1007/BF00187257. 1987.

WILLNER P., et al. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**. 16:525–534. 1992.

WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**. 134(4):319-29, 1997.

WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiol**. 52(2):90-110, 2005.

WILLNER P., et al. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**. 37(10 Pt 1):2331-71. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.12.007. 2013.

WILLNER P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiol Stress**. 24;6:78-93. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing In Mental Health** (2003). (Accessed 9 May 2016). http://www.who.int/mental_health/media/investing_mnh.pdf

XING Y., HE J., et al. Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. **Neurochem Int**. 63(6):570-5. doi: 10.1016/j.neuint.2013.09.019. 2013.

YANG L.M., HU B., et al. Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. **Behav Brain Res**. 17;188(1):84-90. doi: 10.1016/j.bbr.2007.10.022. 2008.

YAMAGUCHI S., HAYASE S., et al. Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). **PLoS One**. 6;12(1):e0169643. doi: 10.1371/journal.pone.0169643. 2017.

YILDIZ A., GULERYUZ S., et al. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania. A double blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. **Arch. Gen. Psychiatry**. 65(3):255-63, 2008.

YOUNG J.W., GOEY A.K., et al. The mania-like exploratory profile in genetic dopamine transporter mouse models is diminished in a familiar environment and reinstated by subthreshold psychostimulant administration. **Pharmacol Biochem Behav**. 96, 7-15. 2010.

YU D., ZHOU H., et al. The bidirectional effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on anxiety- and depression-like behaviors in rats. **Horm Behav**. 69:106-15. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.01.003. 2015.

ZARATE C.A., et al. Thyroid function tests in first-episode bipolar disorder manic and mixed types. **Biol Psychiatry**. 15;42(4):302-4. doi: 10.1016/S0006-3223(97)00250-3. 1997.

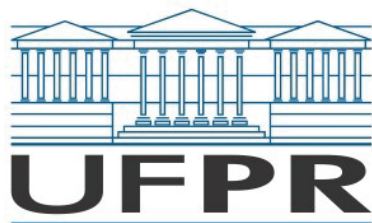
ZENG H., SCHIMPF B.A., et al. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. **Mol Endocrinol**. 21(11):2795-804. doi: 10.1210/me.2007-0048. 2007.

ZEEB F.D., et al. Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. **Neuropsychopharmacol.** 34;2329–43. 2009.

ZHANG Q., FENG J.J., et al. Lateral habenula as a link between thyroid and serotonergic system mediates depressive symptoms in hypothyroidism rats. **Brain Res Bull.** 124:198-205. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.05.007. 2016.

ZHAO H., et al. The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. **Behav Brain Res.** 15;277:89-98. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.016. 2015.

ZHOU L., LIU M.Z., et al. Organization of functional long-range circuits controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Cell Reports.** 18, 3018–3032. 2017.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1321

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: 23075.074227/2019-31

APROVADO/APPROVAL: 19/11/2019 – R.O. 10/2019

TÍTULO: Estresse crônico como modelo no estudo de transtornos tireoidianos comórbidos a alterações de humor.

TITLE: Chronic stress as a model for the study of thyroid disorders and mood disorders comorbidity.

AUTORES/AUTHORS: Roberto Andreatini, Isadora Pozzetti Siba.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 20/12/2019, às 00:32, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAIKO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/09/2020, às 20:22, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2397819** e o código CRC **DBDB0888**.