

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

DIFERENÇAS SEXUAIS E EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS EM MODELO DE MANIA EM RATOS WISTAR

CURITIBA
2022

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

DIFERENÇAS SEXUAIS E EFEITO DO ESTRADIOL SOBRE VOCALIZAÇÕES
ULTRASSÔNICAS EM MODELO DE MANIA EM RATOS WISTAR

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

Co-orientadora: Dra. Ana Segantine
Dornellas Loper

CURITIBA
2022

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

Souza, Camila Pasquini de.

Diferenças sexuais e efeito do estradiol sobre vocalizações ultrassônicas em modelo de mania em ratos Wistar. / Camila Pasquini de Souza. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Roberto Andreatini.

Coorientadora: Ana Segantine Dornellas Loper.

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

1. Transtorno bipolar. 2. Mania. 3. Fêmea. 4. Ovariectomia. 5. Estradiol. I. Título. II. Andreatini, Roberto. III. Loper, Ana Segantine Dornellas. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

ATA Nº321

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

No dia vinte e nove de agosto de dois mil e vinte e dois às 08:30 horas, na sala Anf da Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **CAMILA PASQUINI DE SOUZA**, intitulada: **Diferenças sexuais e efeito do estradiol sobre vocalizações ultrassônicas em modelo de mania em ratos Wistar**, 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), RUBIA MARIA MONTEIRO WEFFORT (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ), JOSE CARLOS FERNANDES GALDUROZ (null), CRISTINA APARECIDA JARK STERN (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 Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 10:22:34.0
ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
05/09/2022 13:28:25.0
RUBIA MARIA MONTEIRO WEFFORT
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 10:27:33.0
JOSE CARLOS FERNANDES GALDUROZ
Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 13:55:55.0
CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

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 **CAMILA PASQUINI DE SOUZA** intitulada: **Diferenças sexuais e efeito do estradiol sobre vocalizações ultrassônicas em modelo de mania em ratos Wistar**, 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 Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 10:22:34.0
ROBERTO ANDREATINI
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
05/09/2022 13:28:25.0
RUBIA MARIA MONTEIRO WEFFORT
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 10:27:33.0
JOSE CARLOS FERNANDES GALDUROZ
Avaliador Externo (null)

Assinatura Eletrônica
01/09/2022 13:55:55.0
CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Roberto Andreatini**, por toda a vivência e anos que passamos trabalhando juntos, por todo o conhecimento e olhar crítico que compartilhou comigo, por me instigar a fazer o meu melhor e começar a indagar minhas próprias perguntas científicas; meu profundo agradecimento e admiração.

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

Ao **Prof. Rainer Schwarting**, meu orientador do doutorado sanduíche, muito obrigada por todo conhecimento compartilhado livremente durante o ano que passei no seu laboratório. Obrigada pelo acolhimento, por toda a experiência vivida, pessoal e profissional de caráter único.

Aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório do Sistema Nervoso Central da UFPR com os quais eu convivi ao longo desses anos **Thiago, Luiza, Etiéli, Débora, Luiz, Isadora, Maryana, Leo, Dani, Ana Maria, Jeferson, Ana Paula, Kellyne**. Muito obrigada pelo apoio, carinho, os perrengues que passamos juntos e as piadas que compartilhamos.

Aos meus colegas do laboratório da Philipps-Universität Marburg **Nicole, Davi, Liana, Özge, Nivo, Theresa, Annuska, Maria** obrigada pelo ano mágico que eu pude vivenciar em Marburg com vocês.

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

À **CAPES** e convênio **CAPES/DAAD- PROBRAL** pelo apoio financeiro.

Ao **Bruno** por tudo, sempre.

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

RESUMO

Períodos de flutuação hormonal, como a pré-menstruação, pós-parto e perimenopausa, parecem ser de alto risco para o desenvolvimento de episódios de depressão e mania em mulheres com transtorno bipolar (TB). Evidências na literatura mostram que a mudança drástica dos níveis de estrógenos, e não sua deficiência, parece ser o gatilho para episódios de humor em algumas pacientes com TB. Este trabalho propôs avaliar o efeito do estradiol (E2) em ratas fêmeas ovariectomizadas (OVX) bem como o efeito da modulação deste receptor e diferenças sexuais apresentadas por machos e fêmeas em comportamentos do tipo maníacos, níveis de monoaminas em regiões relevantes do cérebro e resposta ao lítio em modelo de mania por privação de sono REM de 24h (SD). Foi observado que E2 10 µg/kg administrado à OVX exacerba comportamentos do tipo maníacos (hiperlocomoção e aumento de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz) em modelo de mania por SD. Esses resultados parecem estar relacionados a um efeito rápido (não genômico), e não a um efeito tardio (genômico) da administração de E2. Foi observado também que a administração de um modulador seletivo de receptor de estrogênio, o clomifeno, não induz efeitos em fêmeas ciclando normalmente, mas tem efeito do tipo maníaco em machos e efeito oposto em OVX. Isso mostra que o efeito deste fármaco nos comportamentos avaliados depende de background hormonal do animal teste, e que influências do estradiol nas fêmeas durante todo o desenvolvimento e vida adulta, podem acarretar diferenças duradouras mesmo na ausência do estradiol. Foi observado que machos e fêmeas responderam ao tratamento com lítio, porém com sensibilidades diferentes. OVX não responderam ao modelo e ao lítio, e com a administração aguda de E2 apresentaram os comportamentos do tipo maníaco induzidos pelo modelo e também responderam ao lítio. Por último foi observado um desbalanço no nível de monoaminas, principalmente da dopamina e seu turnover no núcleo accumbens de OVX. Este efeito é atenuado em OVX tratadas agudamente com E2. Este estudo observou que existem parâmetros comportamentais como as USV de 50-kHz que são influenciados por flutuação hormonal em fêmeas e sofrem efeitos importantes de hormônios sexuais, devendo ser investigados mais profundamente para se entender melhor a interação de hormônios sexuais com as vias de sinalização relacionadas a neurobiologia do episódio maníaco do TB, o que também aumentaria a translação dos resultados para a clínica.

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

ABSTRACT

Periods of hormonal fluctuation, such as pre-menstruation, postpartum and perimenopause, appear to be of high risk for the development of episodes of depression and mania in women with bipolar disorder (BD). Evidence in the literature shows that the drastic change in estrogen levels, rather than its deficiency, might be the trigger for mood episodes in some BD patients. This work aimed to evaluate the effect of estradiol (E2) in ovariectomized female rats (OVX) as well as the effect of the modulation of this receptor and sex differences presented by males and females in manic-like behaviors, monoamine levels in relevant brain regions and response to lithium in the 24-hour REM sleep deprivation (SD) mania model. E2 10 µg/kg administered to OVX was observed to exacerbate manic-like behaviors (hyperlocomotion and emission of 50-kHz ultrasonic vocalizations) in a SD model of mania. These results appear to be related to a rapid (non-genomic) effect rather than a late (genomic) effect of E2 administration. It was also observed that the administration of a selective estrogen receptor modulator, clomiphene, does not induce effects in normally cycling females, but has a manic-like effect in males and the opposite effect in OVX. This shows that the effect of this drug on the evaluated behaviors depends on the hormonal background of the test animal, and that the influence of estradiol in female throughout development and adult life can cause lasting differences even in the absence of estradiol. It was observed that male and female rats both responded to lithium treatment, but with different sensitivities. OVX did not respond to either model or lithium, and acute E2 administration exhibited the model-induced manic-like behaviors and also responded to lithium. Finally, an imbalance in the level of monoamines, mainly dopamine, and its turnover in the nucleus accumbens of OVX was observed. This effect is attenuated in OVX treated acutely with E2. This study observed that there are behavioral parameters such as 50-kHz USV that are influenced by hormonal fluctuation in females and suffer important effects of sex hormones, which should be further investigated to better understand the interaction of sex hormones with related signaling pathways. the neurobiology of the manic episode of BD, which would also increase the translation of the results to the clinic.

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Transtorno Bipolar em mulheres	1
1.2. O hormônio sexual estradiol	2
1.3. O estudo do efeito do estradiol na mania em modelo animal	4
1.4. Vocalizações ultrassônicas como um índice de comportamento tipo maníaco em modelo animal	5
1.5 O tratamento do Transtorno Bipolar (TB)	6
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivos específicos:	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1. Animais	10
4.2. Delineamentos Experimentais	10
4.3. Ovariectomia.....	14
4.4. Privação de Sono REM de 24h.....	15
4.5. Drogas	16
4.6. Testes Comportamentais.....	17
4.7. Análise de conteúdo monoaminérgico por HPLC	18
4.8. Análise Estatística	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Estradiol na dose de 10 µg/kg intensifica comportamentos tipos maníacos em modelo de privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas	20
5.2. Efeito rápido do estradiol no aumento dos comportamentos tipos maníacos em modelo de privação de sono REM: possível ação não genômica	24
5.3. O SERM (modulador seletivo de receptor de estrogênio) clomifeno tem efeito sexo-dependente sobre USVs em modelo de mania por privação de sono REM em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas	27
5.3.1. Machos e Clomifeno	27
5.3.2. Fêmeas e Clomifeno	27
5.3.3. OVX e Clomifeno	30

5.4. Diferenças sexuais e efeito do estradiol na resposta ao lítio em modelo de privação de sono	32
5.4.1. Machos e Lítio	32
5.4.2. Fêmeas e Lítio	35
5.4.3. OVX e Lítio	37
5.4.4. OVX+E2 e Lítio	40
5.5. Diferenças sexuais e efeito do estradiol, ovariectomia e privação de sono no conteúdo monoaminérgico no Núcleo Accumbens e Córtex Pré-Frontal	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXO 1	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Transtorno Bipolar em mulheres

O Transtorno Bipolar (TB) é um distúrbio psiquiátrico crônico, caracterizado por episódios recorrentes e cíclicos de depressão e mania e sua prevalência é de aproximadamente 1-4% da população (HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018). Durante um episódio maníaco ocorre uma alteração no humor que se torna persistentemente elevado/irritável, expansivo e energético por pelo menos uma semana. O paciente em estado maníaco também costuma apresentar baixa necessidade de sono, discurso exacerbado, pensamento acelerado com fuga de ideias, dificuldade em manter a atenção e concluir tarefas, sentimento de grandiosidade, bem como hiperssexualidade e aumento de impulsividade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013-; GRANDE *et al.*, 2016).

Embora não haja diferença na prevalência deste transtorno entre homens e mulheres, há algumas diferenças relevantes na sintomatologia e curso da doença que aparentam ser dependentes de sexo. Mulheres apresentam maior prevalência de TB do tipo II, que é caracterizada por episódios de hipomania e depressão e também parecem apresentar mais episódios de ciclotimia, que são recorrentes variações de humor, variando entre hipomania e distímia ou depressão (BENAZZI, 1999; DIFLORIO; JONES, 2010). Além disso, o TB em mulheres normalmente apresenta um quadro de comorbidades diferente do que em homens, tendo maior incidência de distúrbios da tireoide, enxaquecas, obesidade, bulimia e transtornos de ansiedade, bem como estresse pós-traumático (ARNOLD, 2003; BALDASSANO *et al.*, 2005; PARIAL, 2015).

Há evidências epidemiológicas sobre a influência da flutuação hormonal sobre o TB em mulheres (ARNOLD, 2003; DIFLORIO; JONES, 2010; FREY; DIAS, 2014; KHAN *et al.*, 2016), porém, pouco se é estudado em modelo animal. Na clínica, um fator que parece ser de grande relevância para o prognóstico da doença é a influência do ciclo reprodutivo em mulheres que sofrem deste transtorno (DIFLORIO; JONES, 2010). Já foi observado que quedas abruptas de estrogênio podem levar à episódios depressivos, sendo que (DALTON, 1959) observou que de 276 mulheres admitidas em hospitais psiquiátricos, quase metade se encontrava no período pré-menstrual e

que o risco de suicídio dentre essas mulheres era maior nesses dias. Diferentes estudos clínicos reportaram aumento de episódios de flutuação de humor relacionado ao ciclo reprodutivo de mulheres bipolares, como na pré-menstruação (CIRILLO *et al.*, 2012; TEATERO; MAZMANIAN; SHARMA, 2014), pós-parto (KUMAR *et al.*, 2003; LEWIS *et al.*, 2018; THOMSON; SHARMA, 2017) e climatério (PERICH; USSHER; MEADE, 2017; YOUNG; MOLINE; KLEYMAN, 1997).

Apesar da gravidez em si não parecer ser um agravante para transtornos de humor, o pós-parto é um período de alto-risco para o início de sintomas ou recorrência de episódios de depressão e mania (MUNK-OLSEN T *et al.*, 2006; VIGUERA *et al.*, 2011). Um outro fator que parece ser de suma importância para desencadear episódios maníacos no pós-parto é a privação de sono (LEWIS *et al.*, 2018) comumente sofrida por mulheres principalmente nas primeiras duas semanas do puerpério. Quanto ao período de climatério, há poucas evidências de que esse estágio do ciclo reprodutivo feminino seja de alto risco para o diagnóstico de um novo transtorno de humor (PAYNE, 2003). Porém a peri e a pós-menopausa tem sido associados com episódios de flutuação de humor em mulheres já diagnosticadas (KESSLER *et al.*, 1993; MARSH; GERSHENSON; ROTHSCILD, 2015). Episódios de depressão e mania são observados em entre 20 a 50% das mulheres bipolares transicionando pelo climatério (BLEHAR *et al.*, 1998; MARSH; KETTER; RASGON, 2009). Após esse período de transição hormonal, a taxa de episódios de flutuação de humor parece cair (KESSLER *et al.*, 1993), indicando que não seria a deficiência de estrógenos, mas sim a mudança drástica de seus níveis o gatilho para episódios de depressão e mania em algumas mulheres (MEINHARD; KESSING; VINBERG, 2014; PAYNE, 2003).

1.2. O hormônio sexual estradiol

Sendo assim, períodos de flutuação hormonal parecem ser de alto risco para episódios de humor em mulheres com TB. Um destes hormônios sexuais relacionados com a atividade dopaminérgica e capaz de modular comportamentos relacionados com a mania é o estradiol (FREY; DIAS, 2014; PAYNE, 2003; YOEST; CUMMINGS; BECKER, 2014). O estradiol regula o ciclo menstrual e prepara o útero para a gravidez, mas também desenvolve ampla ação no sistema nervoso central

(MEINHARD; KESSING; VINBERG, 2014). Receptores de estrogênio são encontrados em áreas do cérebro envolvidas com a regulação do humor, incluindo o hipotálamo, hipocampo, amígdala, e córtex pré-frontal (MCEWEN; ALVES, 1999; MCEWEN, 2002). O estradiol altera o funcionamento de vários neurotransmissores, modulando por exemplo o sistema serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico e colinérgico (LUINE, 1985; MCEWEN; ALVES, 1999; MCEWEN, 2002; SELLIX *et al.*, 2004).

A ação do estradiol se dá classicamente no cérebro através de sua ação em receptores nucleares ER- α e ER- β (KOVATS, 2015). Na via clássica (genômica) da ação do estrogênio, ele se liga ao seu receptor (ER) induzindo mudanças conformacionais no receptor que promovem a dimerização e a interação deste com outras moléculas. O complexo ligante-receptor se liga com alta afinidade a elementos de resposta ao estrogênio (EREs) nas regiões reguladoras dos genes alvo para ativar ou reprimir a expressão gênica (GLASS, 1994; MCKENNA; LANZ; O'MALLEY, 1999; SMITH; O'MALLEY, 2004; TSAI; O'MALLEY, 1994). Mas sabe-se agora que o estradiol tem ações além daquelas estabelecidas em sua via clássica. O estradiol age por pelo menos três outras vias não clássicas, sendo elas: a sinalização de ER ligante-independente, na qual a ativação do gene ocorre através de vias de segundos mensageiros que alteram a atividade de kinases e fosfatases intracelulares, resultando na alteração da fosforilação dos ER (WEIGEL; ZHANG, 1998); através de sinalização genômica independente do ERE, na qual o ER regula genes independente da ligação direta do DNA via interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição; e através de efeitos rápidos e não genômicos via ER associados à membrana (JAKACKA *et al.*, 2002; KUSHNER *et al.*, 2000; SAFE, 2001; WEBB *et al.*, 1995). Estes receptores de membrana parecem mediar muitos dos efeitos rápidos do estradiol (TORAN-ALLERAND, 2004) como por exemplo a mobilização induzida por estrogênio do cálcio intracelular, a estimulação da atividade da adenilato ciclase e a produção de AMPc (ARONICA; KRAUS; KATZENELLENBOGEN, 1994; IMPROTA-BREARS *et al.*, 1999).

O estradiol é também um fator de crescimento neuronal e, como as neurotrofinas, influencia a neurogênese, a diferenciação neuronal e a sobrevivência neuronal de seus alvos ao longo da vida (BEHL, 2002; GARCIA-SEGURA; AZCOITIA; DONCARLOS, 2001; MCEWEN, 2002; WANG *et al.*, 2002). Foi observado também que o estradiol tem efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo (IRWIN *et al.*,

2008; NUMAKAWA *et al.*, 2011). Este efeito antioxidante também é encontrado em estabilizadores de humor e drogas com efeito antimaníaco como o lítio e valproato de sódio (ANDREAZZA *et al.*, 2008; FREY *et al.*, 2006). Alterações na transmissão dopaminérgica já vem sendo relacionadas a mania no TB (ASHOK *et al.*, 2017; MARTINOWICH; SCHLOESSER; MANJI, 2009), sendo que vários estudos farmacológicos e de imagem suportam a hipótese de que no episódio maníaco, o paciente se encontra em um estado de hiperdopaminergia, com aumento de disponibilidade de receptores D2/3 e hiperatividade de vias de recompensa (para uma revisão, veja: (ASHOK *et al.*, 2017). No estriado, o estradiol modula rapidamente a liberação de dopamina pela ligação aos receptores de estradiol da membrana (BECKER, 2005; MERMELSTEIN, 2009; MORISSETTE *et al.*, 2008) e está altamente relacionado com comportamentos motivados (YOEST; CUMMINGS; BECKER, 2014).

Além disso, vários estudos já reportaram a ação do estradiol sobre a PKC, enzima envolvida no TB, levando a sua ativação (DEWING *et al.*, 2008; KELLY *et al.*, 1999; KOW; BROWN; PFAFF, 1994). Já foi observado em modelo animal que estradiol via sinalização rápida por ER de membrana é capaz de aumentar a sinalização de PKC no hipotálamo de fêmeas, induzindo à hiperssexualidade (DEWING *et al.*, 2008). Estudos reportam que o aumento da expressão desta enzima em pacientes maníacos estaria relacionado à hiperatividade motora, comportamento de risco e comportamento hedônico excessivo (HAHN; FRIEDMAN, 1999; WANG; FRIEDMAN, 1996). O tratamento com lítio é capaz de diminuir a atividade da PKC α hipocampal associada a membrana e inibir translocação de PKC para a membrana (MANJI *et al.*, 1993; WANG; FRIEDMAN, 1989) em modelos animais.

1.3. O estudo do efeito do estradiol na mania em modelo animal

Apesar de evidências da influência do estradiol em vias de sinalização dopaminérgicas e comportamentos relacionados à mania, ainda há poucos estudos pré-clínicos que foquem no TB em fêmeas e que levem em consideração o efeito da flutuação hormonal em modelo de mania. A ovariectomia bilateral em fêmeas é capaz de modelar a perda de hormônios ovarianos e é comumente utilizada como modelo de climatério (BAEZA *et al.*, 2010). Mas além disso, a ovariectomia é um bom modelo para se avaliar o efeito de um hormônio sexual específico, sem o efeito da ciclagem

hormonal ou a presença de outros hormônios ovarianos no organismo do animal. Neste estudo, portanto, será utilizado este modelo de ausência hormonal, para se avaliar o efeito da modulação unicamente do estradiol em regime clássico e rápido sobre comportamentos tipo maníacos.

A pesquisa sobre o transtorno de humor bipolar e a compreensão da sua fisiopatologia ainda são dificultadas pela falta de modelos animais apropriados (KARA; EINAT, 2013). A utilização de mais de um modelo de indução de comportamento tipo maníaco diferente é, portanto, uma das precauções que podem ser tomadas para aumentar a validade do estudo e poder propiciar uma comparação dos *endpoints* comportamentais e moleculares a serem avaliados entre os modelos. A privação de sono REM é um modelo não-farmacológico de mania que leva a uma gama de alterações comportamentais semelhantes à um episódio maníaco, sendo também relevante à clínica, já que a interrupção do sono é um dos principais sinais do início do quadro maníaco (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Além disso, a privação de sono é observada na clínica no pós-parto e climatério (LEWIS *et al.*, 2018), podendo ser um agravante indutor dos episódios de flutuação de humor nestes períodos. Privação de sono pode exacerbar episódios maníacos e também levar a viradas maníacas ou agravar a sintomatologia em pacientes com TB (BARBINI *et al.*, 1996; WEHR *et al.*, 1982).

1.4. Vocalizações ultrassônicas como um índice de comportamento tipo maníaco em modelo animal

Alguns animais, dentre eles os ratos, são capazes de emitir vocalizações ultrassônicas (USVs) em determinadas situações relacionadas a comunicação social e de seus estados emocionais internos (BRUDZYNSKI, 2015; WÖHR; SCHWARTING, 2013). Estas vocalizações têm sido classificadas em duas categorias básicas: USVs de 22 kHz, que ocorrem em situações aversivas (BORTA; WÖHR; SCHWARTING, 2006; VAN DER POEL; MICZEK, 1991), provavelmente expressando um estado afetivo negativo e servindo uma função comunicativa de alarme; e as USVs de 50-kHz que ocorrem em situações apetitivas, incluindo *rough and tumble play* (KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 1998; LUKAS; WÖHR, 2015) e cócegas (BURGDORF; PANKSEPP, 2001; SCHWARTING; JEGAN; WÖHR, 2007) e,

portanto, parecem expressar um estado afetivo positivo (BURGDORF; PANKSEPP; MOSKAL, 2011).

A emissão de USV de 50-kHz pode ser induzida não farmacologicamente em modelos de mania como a privação de sono REM (WENDLER *et al.*, 2019), ou farmacologicamente, como por administração de anfetamina sistêmica ou diretamente no núcleo accumbens (BURGDORF *et al.*, 2007; BURGDORF; PANKSEPP; MOSKAL, 2011; RIPPBERGER *et al.*, 2015; WÖHR; SCHWARTING, 2013). Além disso, fármacos utilizados na clínica no tratamento de episódios de mania (antipsicóticos e lítio) são capazes de bloquear o aumento de USV de 50-kHz induzido por psicoestimulantes em modelo animal de mania (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2016, 2019). Diferentes modelos animais de indução de comportamento tipo maníaco parecem levar a perfis de USV diferentes (WENDLER *et al.*, 2016) mesmo havendo hiperlocomoção em ambos, sugerindo que diferentes estados afetivos são induzidos nestes modelos animais de mania e que a análise de mais de um parâmetro comportamental, como as USVs de 50-kHz, seria capaz de captar essas diferenças.

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

1.5 O tratamento do Transtorno Bipolar (TB)

O tratamento do TB é complexo devido à sua característica cíclica entre polos opostos do humor. O estabilizador de humor lítio tem sido utilizado como principal tratamento para o TB por muito tempo, além do valproato de sódio, ambos utilizados na profilaxia e manutenção da doença (HARRISON; GEDDES; TUNBRIDGE, 2018). Um dos mecanismos de ação do lítio é diminuir a reciclagem de inositol a partir de fosfatos de inositol e síntese *de novo* de inositol (WILLIAMS *et al.*, 2002). O lítio

também é um inibidor direto da GSK-3, e indireto através de mecanismos que envolvem ativação da Akt e interrupção de um complexo de sinalização formado por β -arrestina 2/PP2A, complexo esse que medeia parte da sinalização de receptor D2 (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2007; CHALECKA-FRANASZEK; CHUANG, 1999; ZHANG *et al.*, 2003). Além disso, o lítio é capaz de inibir a atividade da enzima PKC, que faz parte da via de sinalização interna de receptores dopaminérgicos (MALHI *et al.*, 2013) e é uma das proteínas quinases que regulam a fosforilação de GSK-3 (GOODE *et al.*, 1992). O haloperidol é um antipsicótico típico (antagonista D2) comumente utilizado para tratar episódios agudos de mania com agitação como monoterapia ou como adjuvante ao tratamento com lítio ou valproato de sódio (CIPRIANI; RENDELL; GEDDES, 2006). Outro fármaco com potencial no tratamento do TB é o tamoxifeno, um fármaco antiestrogênico sintético inicialmente utilizado para o tratamento do câncer de mama e a prevenção da osteoporose (TALAEI *et al.*, 2016). Apesar de ser um antiestrogênico, estudos demonstram que os efeitos anti-maníacos do tamoxifeno parecem ser atribuídos principalmente aos seus efeitos de inibição da enzima PKC (ARMANI; ANDERSEN; GALDURÓZ, 2014; SABIONI *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

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

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do estradiol na indução do comportamento tipo maníaco e sua reversão em ratos Wistar.

3.1. Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito do estradiol (E2) em fêmeas ovariectomizadas através de uma curva dose-resposta em 3 diferentes doses (0.1, 1 e 10 $\mu\text{g/kg}$) sobre comportamentos induzidos por modelo de mania (emissão de USVs de 50-kHz, hiperlocomoção e comportamento exploratório) por privação de sono REM
2. Avaliar o efeito rápido (não genômico) e o efeito tardio (genômico) do estradiol (E2) em fêmeas ovariectomizadas em 3 diferentes tempos de administração (10 minutos, 2 e 48 horas) sobre comportamentos induzidos por modelo de mania (emissão de USVs de 50-kHz, hiperlocomoção e comportamento exploratório) por privação de sono REM
3. Estudar o efeito do tratamento agudo com o modulador seletivo de receptor de estrogênio clomifeno sobre comportamentos induzidos por modelo de mania (emissão de USVs de 50-kHz, hiperlocomoção e comportamento exploratório) por privação de sono REM em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas.
4. Avaliar o efeito diferencial em resposta ao lítio em comportamentos induzidos por modelo de mania (emissão de USVs de 50-kHz, hiperlocomoção e comportamento exploratório) por privação de sono REM em machos, fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com estradiol.
5. Analisar as alterações no nível de monoaminas no córtex pré-frontal e núcleo accumbens induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em machos, fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com estradiol utilizando técnica de dosagem por HPLC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar entre 2-3 meses, provenientes do Complexo Biotério do setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (60 X 25 X 25 cm), 4 animais por caixa, sob temperatura controlada (22 ± 3 °C), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h) e água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram submetidos ao comitê de ética da UFPR (Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR) e aprovados sob o número #1175 (certificado Anexo 1).

4.2. Delineamentos Experimentais

Experimento 1: Efeito do estradiol (E2) em 3 diferentes doses (0.1, 1 e 10 µg/kg) sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM

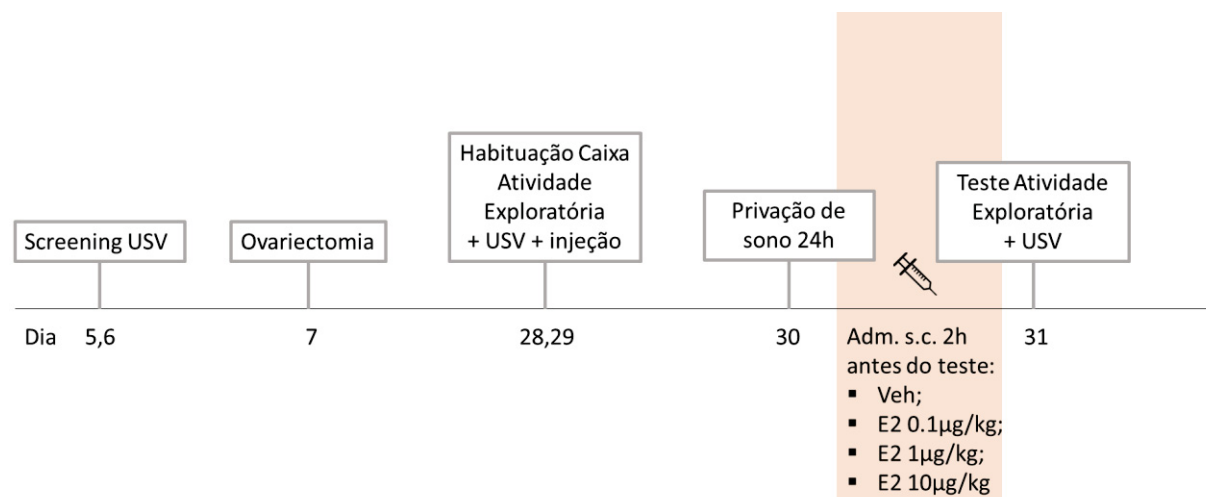


Figura 1: Delineamento experimental utilizado para o experimento 1. Screening USV= triagem de vocalizações espontâneas. USV= vocalizações ultrassônicas de 50-kHz. E2= estradiol (17-β-estradiol).

Fêmeas de 60 dias foram habituadas ao biotério e experimentador e após, passaram por uma triagem de vocalizações espontâneas. Essa triagem serviu para fazer uma randomização estratificada destes animais dentre os grupos experimentais.

Através de um rankeamento, os baixo vocalizadores e alto vocalizadores foram distribuídos de maneira uniforme entre todos os grupos experimentais. No dia seguinte, os animais passaram por cirurgia de ovariectomia bilateral para retirada dos ovários e após passaram por um período de 3 semanas de recuperação e queda hormonal. Após este período os animais passaram por um dia de habituação à caixa experimental e um dia de habituação à administração de salina. No dia seguinte, os grupos experimentais privados de sono passaram pela privação de sono REM de 24h, enquanto os animais controles seguiram isolados neste mesmo período. Imediatamente após as 24h de privação de sono e após os devidos tempos de administração de drogas, os animais foram colocados na caixa experimental em que foi testada a hiperlocomoção, atividade exploratória e emissão de USVs de 50-kHz destes animais por 10 minutos. Após, os animais foram devidamente eutanasiados.

Experimento 2: Efeito rápido (não genômico) e tardio (genômico) do estradiol (E2) em 3 diferentes tempos de administração (10 minutos, 2 e 48 horas), sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas

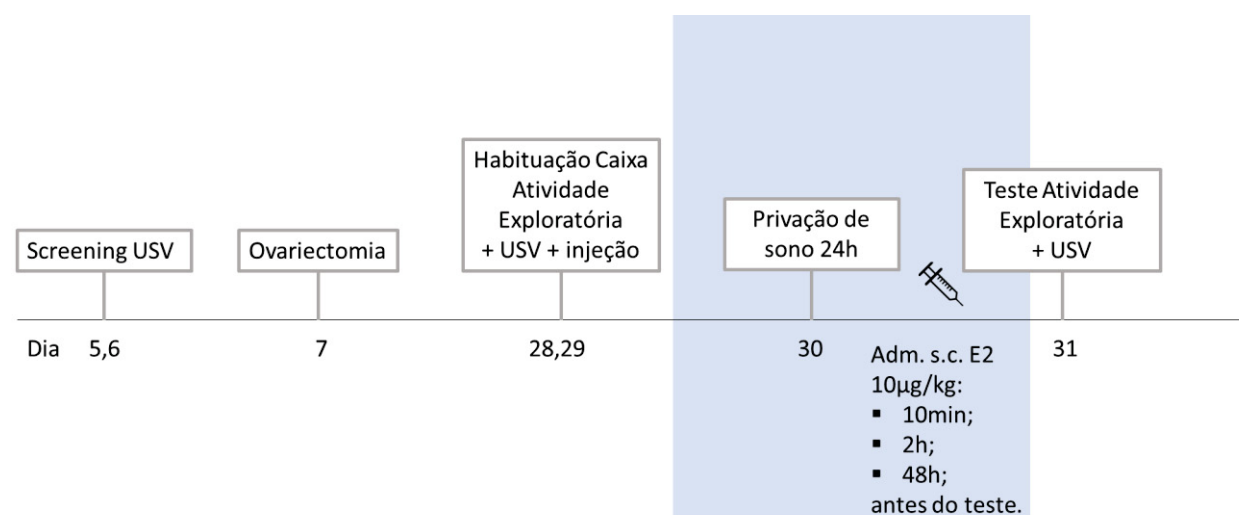


Figura 2: Delineamento experimental utilizado para o experimento 2. Screening USV= triagem de vocalizações espontâneas. USV= vocalizações ultrassônicas de 50-kHz. E2= estradiol (17-β-estradiol).

Fêmeas de 60 dias foram habituadas ao biotério e experimentador e após, passaram por uma triagem de vocalizações espontâneas. Essa triagem serviu para

fazer uma randomização estratificada destes animais dentre os grupos experimentais. Através de um rankeamento, os baixo vocalizadores e alto vocalizadores foram distribuídos de maneira uniforme entre todos os grupos experimentais. No dia seguinte, os animais passaram por cirurgia de ovariectomia bilateral para retirada dos ovários e após passaram por um período de 3 semanas de recuperação e queda hormonal. Após este período os animais passaram por um dia de habituação à caixa experimental e um dia de habituação à administração de salina. No dia seguinte, os grupos experimentais privados de sono passaram pela privação de sono REM de 24h, enquanto os animais controles seguiram isolados neste mesmo período. Imediatamente após as 24h de privação de sono e após os devidos tempos de administração de drogas, os animais foram colocados na caixa experimental em que foi testada a hiperlocomoção, atividade exploratória e emissão de USVs de 50-kHz destes animais por 10 minutos. Após, os animais foram devidamente eutanasiados.

Experimento 3: Efeito do tratamento agudo com o modulador seletivo de receptor de estrogênio clomifeno (3 mg/kg) sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas

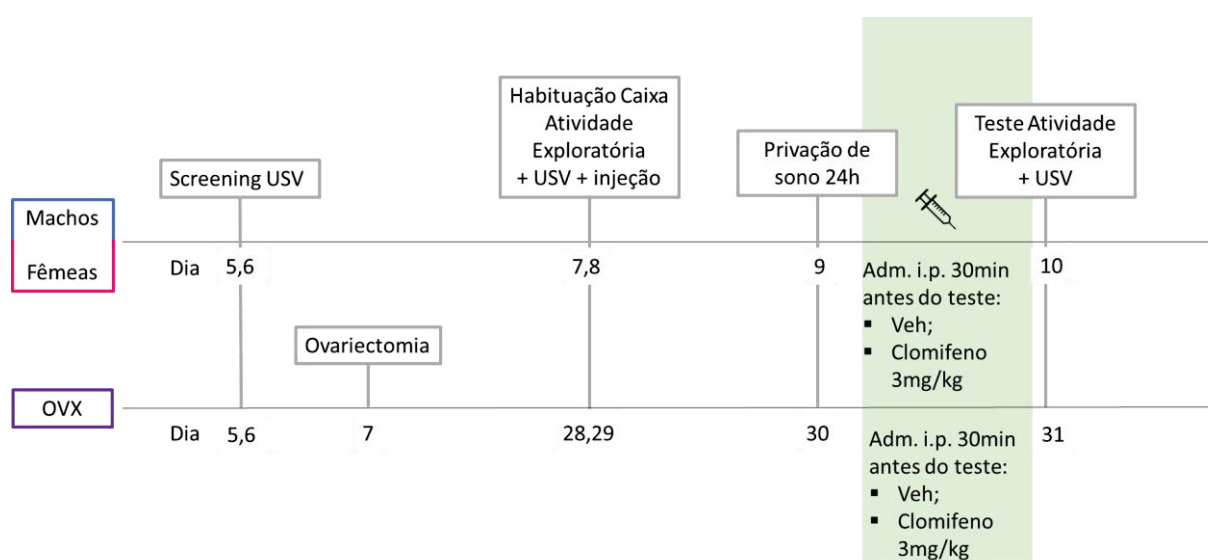


Figura 3: Delineamento experimental utilizado para o experimento 3. OVX= grupo de fêmeas ovariectomizadas. Screening USV= triagem de vocalizações espontâneas. USV= vocalizações ultrassônicas de 50-kHz.

Machos e fêmeas de 60 dias foram habituadas ao biotério e experimentador e após, passaram por uma triagem de vocalizações espontâneas. Essa triagem serviu para fazer uma randomização estratificada destes animais dentre os grupos experimentais. Através de um rankeamento, os baixo vocalizadores e alto vocalizadores foram distribuídos de maneira uniforme entre todos os grupos experimentais. No dia seguinte, os animais passaram por um dia de habituação à caixa experimental e um dia de habituação à administração de salina. O grupo de fêmeas OVX (ovariectomizadas) passaram pelo mesmo delineamento cirurgico e cronológico descrito nos experimentos 1 e 2. No dia seguinte, os grupos experimentais privados de sono passaram pela privação de sono REM de 24h, enquanto os animais controles seguiram isolados neste mesmo período. Imediatamente após as 24h de privação de sono e após os devidos tempos de administração de drogas, os animais foram colocados na caixa experimental em que foi testada a hiperlocomoção, atividade exploratória e emissão de USVs de 50-kHz destes animais por 10 minutos. Após, os animais foram devidamente eutanasiados.

Experimento 4: Diferenças de sexo e níveis hormonais de estradiol sobre a resposta ao lítio em comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em machos, fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas tratadas com estradiol

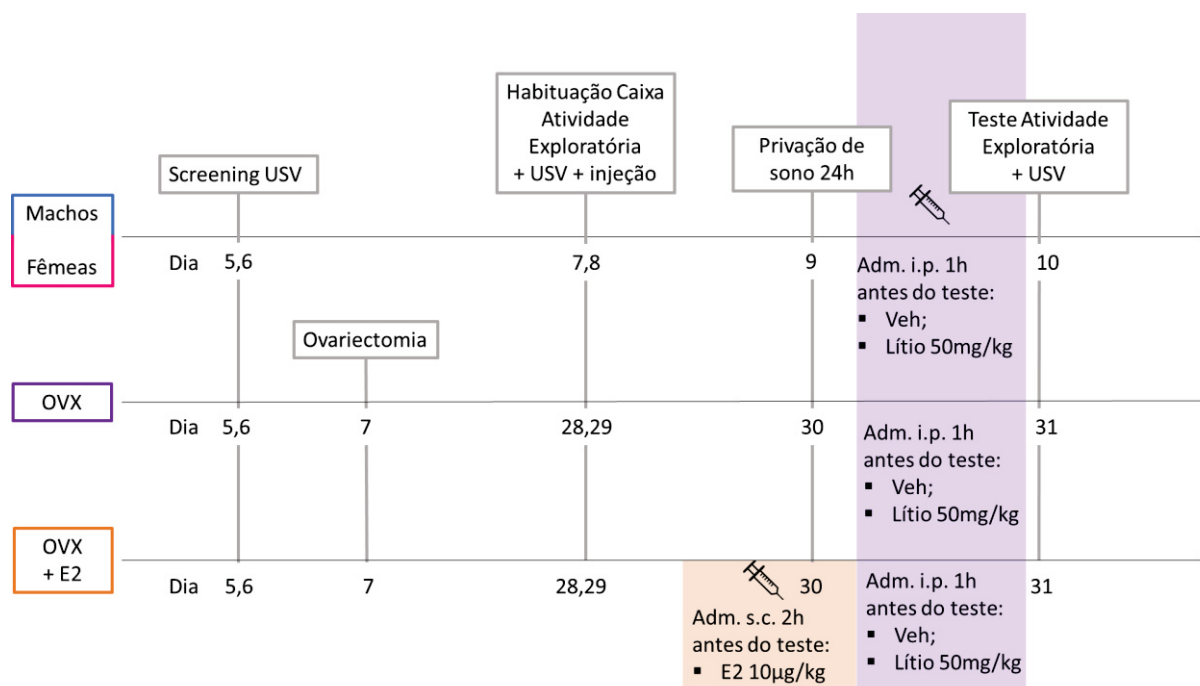


Figura 4: Delineamento experimental utilizado para o experimento 4. OVX= grupo de fêmeas ovariectomizadas. OVX + E2= grupo de fêmeas ovariectomizadas que receberam administração aguda de estradiol antes dos testes comportamentais. Screening USV= triagem de vocalizações espontâneas. USV= vocalizações ultrassônicas de 50-kHz. E2= estradiol (17- β -estradiol).

Machos e fêmeas de 60 dias foram habituadas ao biotério e experimentador e após, passaram por uma triagem de vocalizações espontâneas. Essa triagem serviu para fazer uma randomização estratificada destes animais dentre os grupos experimentais. Através de um rankeamento, os baixo vocalizadores e alto vocalizadores foram distribuídos de maneira uniforme entre todos os grupos experimentais. No dia seguinte, os animais passaram por um dia de habituação à caixa experimental e um dia de habituação à administração de salina. O grupo de fêmeas OVX (ovariectomizadas) passaram pelo mesmo delineamento cirurgico e cronológico descrito nos experimentos 1 e 2. No dia seguinte, os grupos experimentais privados de sono passaram pela privação de sono REM de 24h, enquanto os animais controles seguiram isolados neste mesmo período. Imediatamente após as 24h de privação de sono e após os devidos tempos de administração de drogas, os animais foram colocados na caixa experimental em que foi testada a hiperlocomção, atividade exploratória e emissão de USVs de 50-kHz destes animais por 10 minutos. Após, os animais foram devidamente eutanasiados.

4.3. Ovariectomia

As ratas Wistar passaram por cirurgia de ovariectomia (processo cirúrgico de remoção dos ovários). Com 80 dias, os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg) antes de passarem pelo processo de ovariectomia bilateral. Através de uma incisão dorsolateral transversal da pele e músculo, entre a última costela e a pélvis, a cavidade abdominal é exposta. A trompa de Falópio é ligada por sutura e o ovário é removido cortando acima da área suturada. Após, músculo e tecido são suturados com fio de poligalactina. Este procedimento é repetido para o outro ovário (DA SILVA MOREIRA *et al.*, 2016). Todos os animais receberam dipirona (25 mg/kg) por até 3 dias após a cirurgia e passaram por um período de recuperação de 3 semanas para que houvesse a queda hormonal endógena e

adaptação a esta perda hormonal antes do início dos testes comportamentais (BENMANSOUR *et al.*, 2009).

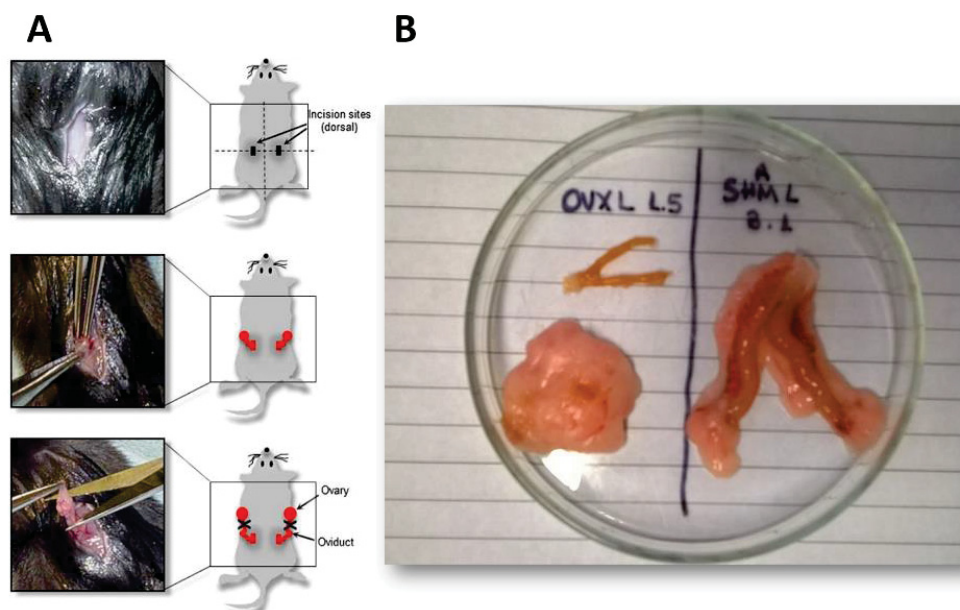


Figura 5: Ilustração e esquema do processo de cirurgia bilateral (A) para remoção dos ovários (figura adaptada Benmansour, 2009) e foto (B) de demonstração do útero atrofiado típico de fêmea sem a presença de hormônios sexuais após 1 mês da ovariectomia (à esquerda) assim como o aumento de gordura abdominal, ambos em relação à uma fêmea SHAM controle (à direita) (Fonte: o autor).

4.4. Privação de Sono REM de 24h

Cada animal privado de sono foi colocado individualmente em uma plataforma cilíndrica de 6,5 cm de diâmetro em uma caixa (23×23×30 cm) cercado por água a 1 cm abaixo da plataforma (ABRIAL *et al.*, 2015; GESSA *et al.*, 1995) por um período de 24h.

No início de cada episódio de sono REM, o animal sofre de uma perda do tônus muscular e cai na água, sendo assim despertado. Quando plataformas deste tamanho são utilizadas, o sono REM é completamente suprimido (GESSA *et al.*, 1995; YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Durante o estudo, a sala experimental era mantida em condições controladas (22 ± 2 °C, 12 h ciclo claro / escuro, luzes iniciando as 07:00 a.m.). O grupo controle foi mantido em ambiente diferente dos ratos privados de sono REM para evitar influência das vocalizações dos animais em privação sobre os animais não privados. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*, sendo colocados

pellets de comida e garrafas de água em uma grade localizada no topo da caixa de privação.

Imediatamente após o final do protocolo de privação de sono, se é observado um período de hiperlocomoção e agitação destes animais (GESSA *et al.*, 1995) de 30-40 minutos.

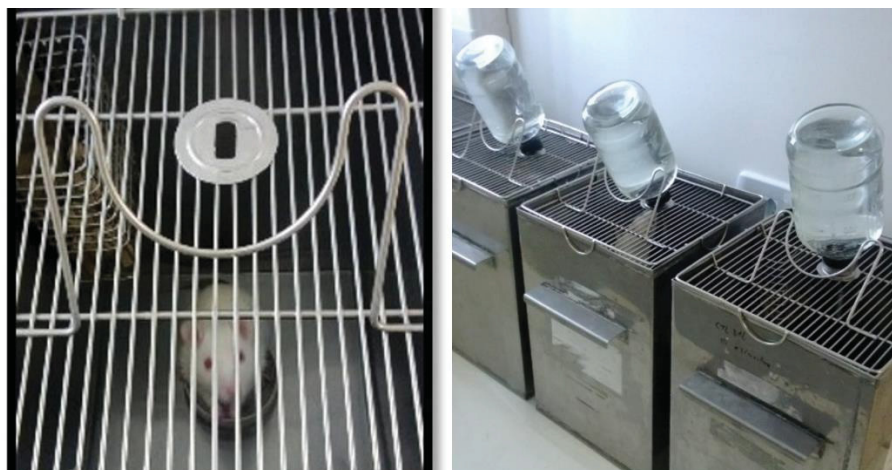


Figura 6: Foto dos latões de privação de sono REM utilizados neste trabalho (Fonte: o autor).

4.5. Drogas

17 β -estradiol (E2) (Sigma, EUA) – 0.1, 1 ou 10 μ g/kg foi dissolvido em óleo de canola e administrado por via subcutânea (s.c.) 10 minutos, 2 horas (ÖSTERLUND; HURD, 1998) ou 48 horas (VEDDER *et al.*, 2013) antes dos testes comportamentais. Os controles receberam seu veículo óleo de canola. A dose de 10 μ g/kg é utilizada para manutenção artificial do ciclo estral, comparável aos níveis normais de estradiol no pico hormonal do ciclo estral (pró-estro) em ratas (GERRITS *et al.*, 2005; TER HORST *et al.*, 2009).

Citrato de clomifeno (Clomiphene) (Clomid, Medley Laboratories, Campinas, SP, Brasil)- 3,0 mg/kg foi dissolvido em óleo de canola, administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) 30 minutos antes dos testes comportamentais (PEREIRA *et al.*, 2011).

Carbonato de lítio (LIT) (Eurofarma- Itapevi, SP-Brasil) – 50 mg/kg, dissolvido em salina com Tween 80% (1% vol/vol) e ajustado ao pH de 7.4, foi administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) 1 hora antes dos testes comportamentais (WENDLER *et al.*, 2016).

4.6. Testes Comportamentais

Hiperlocomoção e exploração em caixa de atividade

A avaliação comportamental de hiperlocomoção induzida por modelo de mania foi realizada em uma caixa de acrílico (40 x 40 x 50 cm) forrada com cepilho limpo, ambiente que favorece a emissão de vocalizações apetitivas de 50-kHz (NATUSCH; SCHWARTING, 2010). Os animais primeiramente passaram por uma exposição ao campo aberto forrado com cepilho por 10 minutos sem administração de nenhuma droga ou qualquer outra manipulação; e uma segunda habituação em que eles foram expostos à administração de salina utilizando as vias de administração que serão empregadas no dia do teste. Após o protocolo de privação de sono por 24h, seus comportamentos foram avaliados na sessão teste. A atividade locomotora e exploratória destes animais foi monitorada e analisada por 10 minutos através da contagem de quadrantes percorridos e número de levantadas nas patas traseiras, os “rearings” (WENDLER *et al.*, 2016, 2019).

Análise da Vocalização Ultrassônica (USV) de 50-kHz

Os animais foram separados em grupos de 4 animais por caixa e após uma semana de habituação, eles foram manipulados por cinco dias no intuito de evitar que a manipulação do pesquisador fosse uma situação de estresse que comprometesse o comportamento do animal. Posteriormente, devido à grande variabilidade interindividual na emissão de chamadas de 50 kHz, os animais passaram por duas sessões de screening de vocalizações espontâneas. A média destes screenings serviu de base para que fosse feita uma randomização estratificada destes animais por grupo experimental.

O Microfone Condensador UltraSoundGate CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha) foi utilizado para capturar as vocalizações e foi colocado 45 cm acima do centro do piso da caixa de teste. Os dados acústicos foram registrados utilizando o programa Avisoft RECORDER (versão 2.95, Avisoft Bioacoustics). As USVs foram registradas no teste de gaiola (uma caixa de acrílico transparente 40 x 40 x 40 cm), com cama fresca, sob 4 lux de luminosidade.

As gravações de áudio foram armazenadas como arquivos .WAV que foram transferidos para um sistema baseado em deep learning machine chamado DeepSqueak (COFFEY; MARX; NEUMAIER, 2019). Ao dividir os arquivos de áudio em segmentos curtos e convertê-los em sonogramas, o DeepSqueak detecta vocalizações executando as imagens geradas em um detector de objetos Faster-RCNN (rede neural convolucional regional). As detecções foram, posteriormente, analisadas com uma rede post-hoc denoiser treinada pela autora. Esta etapa discrimina automaticamente os USVs do ruído de fundo comum típico dessas gravações. Todas as USVs emitidas acima da faixa de 33-kHz foram consideradas USVs de 50-kHz. A partir desta análise, dados como o número total de 50kHz-USV, e parâmetros acústicos como tempo total de vocalização e duração média de cada vocalização foram extraídas e computadas na análise de dados totais.

4.7. Análise de conteúdo monoaminérgico por HPLC

Para análise neuroquímica do conteúdo monoaminérgico, o córtex pré-frontal (PFC) e o e o núcleo accumbens (NAc) foram homogeneizados individualmente em ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio, e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina foi usada como padrão interno (1,0 µl/µg de tecido cerebral). A solução foi então centrifugada a 10.000 rpm por 25 min a 4°C. Vinte µL desta solução foi injetado no cromatógrafo. A fase móvel (pH 4,0) foi composta por ácido cítrico monohidratado (Merck, EUA), ácido octano-1-sulfônico (Merck, EUA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; Sigma, EUA) e 900 ml de água deionizada e filtrada em um filtro de 0,45 µm. Por último, metanol (Merck) foi adicionado para uma composição final de 10% de metanol (v/v).

A concentração de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) foram avaliadas por HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica. O sistema consiste em uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RPC-18 (150 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 4 µm) equipada com uma pré-coluna de 4,0 × 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP); um detector eletroquímico (detector eletroquímico ESA Coulochem III) equipado com uma célula de guarda (ESA 5020), com o eletrodo regulado para 350 mV e uma célula analítica de eletrodo duplo (ESA 5011A); e uma bomba LC-20AT

(Shimadzu, EUA) equipada com um injetor manual Rheodyne 7725 com loop de 20 μ L. A coluna foi mantida em um forno com temperatura controlada (25°C). A célula possui duas câmaras em série: cada câmara inclui um eletrodo colorimétrico de grafite poroso, um contra eletrodo duplo e um eletrodo de referência duplo. O potencial oxidante foi estabelecido em 100 mV para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo eletrodo. Soluções padrão de 5-HT, DA, NA, HVA e DOPAC foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL em ácido perclórico 0,1 M; estas soluções foram diluídas em água desionizada em três concentrações de calibração na faixa de 25-100 ng/ml. As áreas de pico dos padrões foram usadas para quantificar os picos da amostra. O turnover de DA foi calculado pela razão DOPAC+HVA/DA. Os dados foram expressos em ng/g de tecido.

4.8. Análise Estatística

Os dados tanto comportamentais quanto neuroquímicos foram analisados por ANOVA de duas vias (em geral: Fator indução de comportamento tipo maníaco x Fator tratamento), seguido de *post-hoc* de Newman-Keuls. Valor de p foi considerado estatisticamente relevante quando menor que 0.05. Estatísticas foram feitas no programa STATISTICA 12. Gráficos foram feitos usando o software GraphPad Prism 7.

5. RESULTADOS

5.1. Estradiol na dose de 10 µg/kg intensifica comportamentos tipos maníacos em modelo de privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas

O primeiro experimento realizado foi uma curva dose-resposta para a avaliação do efeito do estradiol (E2) em 3 diferentes doses (0.1, 1 e 10 µg/kg) sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM. O primeiro parâmetro comportamental avaliado foi a locomoção (Figura 7A). Para avaliar o efeito do E2 neste comportamento, foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol) e foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,70)} = 5,75$; $p=0.019$] e Tratamento com Estradiol [$F_{(3,70)} = 9,52$; $p<0.001$] sem interação entre esses fatores. *Post-hoc* de Newman Keuls para o fator estradiol mostrou que grupos tratados com E2 na dose de 10 µg/kg se locomoveram mais que os outros.

Para avaliar o efeito da fase do estradiol no comportamento de *rearing* (Figura 7B), foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Novamente foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,70)} = 31,36$; $p<0.001$] e Tratamento com Estradiol [$F_{(3,70)} = 12,54$; $p<0.001$] sem interação entre esses fatores. *Post-hoc* de Newman Keuls para o fator estradiol mostrou que grupos tratados com E2 na dose de 10 µg/kg fizeram mais *rearing* que os demais.

Para a análise efeito do estradiol na emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 7C) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,70)} = 45,23$; $p<0.001$] quanto de tratamento com estradiol: [$F_{(3,70)} = 22,90$; $p<0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(3,70)} = 15,52$; $p<0.001$]. O teste *post-hoc* de

Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono tratado com veículo teve aumento de USV's em relação ao seu controle, e que o grupo tratado com E2 10µg/kg emitiu mais vocalização que todos os outros grupos privados de sono.

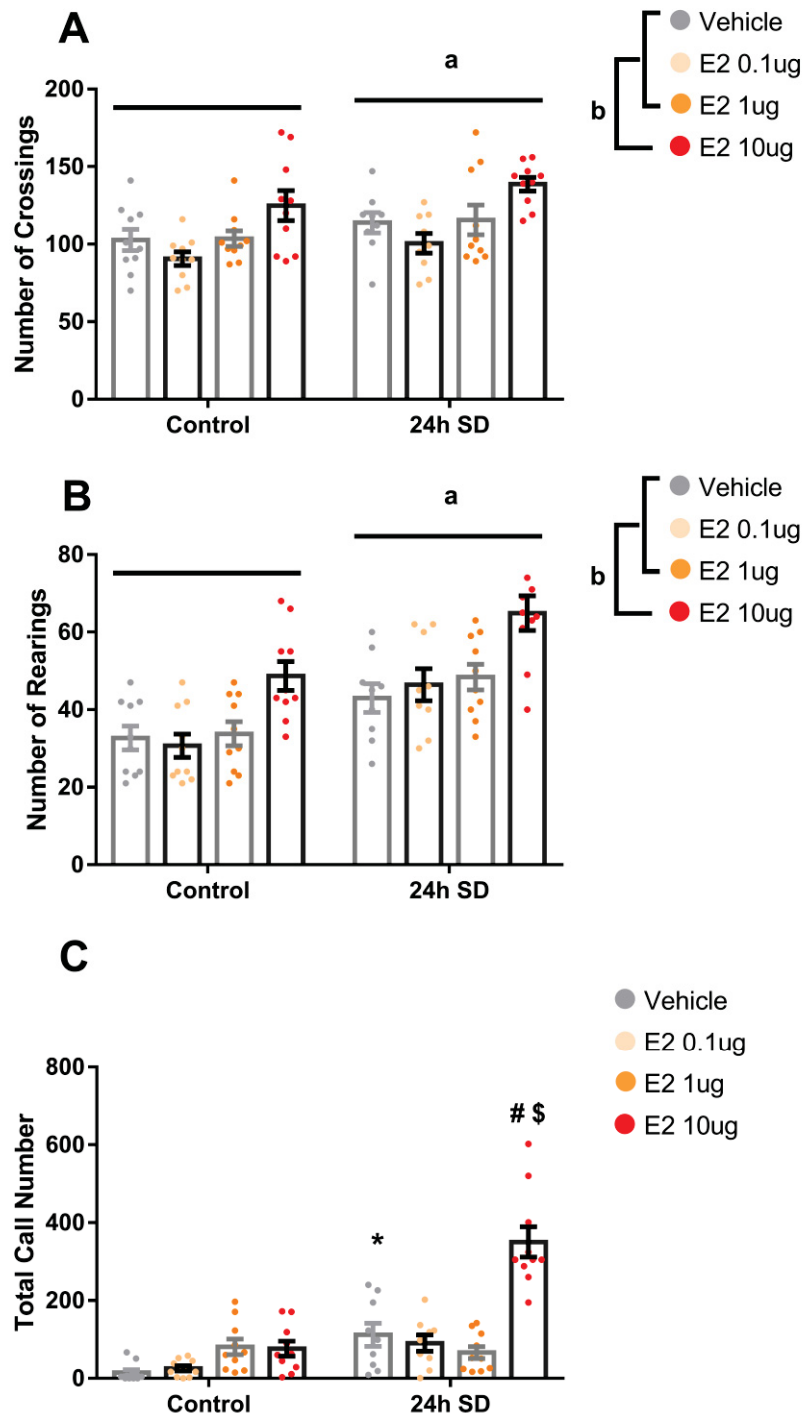


Figura 7: Curva Dose-Resposta de tratamento com estradiol sistêmico (E2) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por privação de sono (SD). 7A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 7B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório); 7C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por SD (privação de sono). Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Vehicle n=10; Control-E2 0.1 μ g/kg n=10; Control-E2 1 μ g/kg n=10; Control-E2 10 μ g/kg n=10; SD-Vehicle n=9; SD-E2 0.1 μ g/kg n=9; SD-E2 1 μ g/kg n=10; SD-E2 10 μ g/kg n=10. ^a= p<0.05 $\neq$ no fator Privação de Sono. ^b= p<0.05 $\neq$ no fator Tratamento com Estradiol. * = p<0.05 $\neq$ em relação ao grupo Control-Vehicle. # = p<0.05 $\neq$ em relação ao grupo SD-Vehicle. \$ = p<0.05 $\neq$ de todos os outros grupos.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 1). Em relação ao tempo total de vocalização (total call time) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,70)} = 29,88$; $p < 0.001$] quanto de tratamento com estradiol: [$F_{(3,70)} = 20,25$; $p < 0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(3,70)} = 10,87$; $p < 0.001$], sendo que o grupo SD tratado com E2 10 μ g/kg apresentou um maior tempo de vocalização que os outros grupos. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) não foi observado efeito de privação de sono ou de tratamento com estradiol, mas houve interação destes fatores: [$F_{(3,70)} = 3,92$; $p = 0.012$], sendo que todos os grupos diferiram do grupo controle tratado com veículo.

Tabela 1: Curva Dose-Resposta de tratamento com estradiol agudamente sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratas OVX privadas de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEHICLE	0.15 $\pm$ 0.08	5.60 $\pm$ 1.63
CONTROL -E2-0.1 μ g	0.26 $\pm$ 0.06	10.14 $\pm$ 1.43 *
CONTROL -E2-1 μ g	1.08 $\pm$ 0.34	12.44 $\pm$ 1.25 *
CONTROL -E2-10 μ g	1.11 $\pm$ 0.40	11.88 $\pm$ 1.31 *
SD-VEHICLE	1.27 $\pm$ 0.34	11.31 $\pm$ 0.58 *
SD -E2-0.1 μ g	0.99 $\pm$ 0.24	10.44 $\pm$ 0.98 *
SD -E2-1 μ g	0.75 $\pm$ 0.20	10.64 $\pm$ 0.60 *
SD -E2-10 μ g	3.86 $\pm$ 0.33*#	10.56 $\pm$ 1.34 *

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono; E2= estradiol. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados expressos por média $\pm$ EPM. Dados em negrito= estatisticamente significativos. *= $p < 0.05$ em comparação ao grupo CONTROL-VEHICLE. #= $p < 0.05$ em comparação ao grupo SD-VEHICLE.

5.2. Efeito rápido do estradiol no aumento dos comportamentos tipos maníacos em modelo de privação de sono REM: possível ação não genômica

Em seguida foi avaliado o efeito rápido e o efeito genômico do estradiol (E2) na dose escolhida de 10 µg/kg em 3 diferentes tempos de administração (10 minutos, 2 e 48 horas), sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas. O primeiro parâmetro comportamental avaliado foi a locomoção (Figura 8A). Para avaliar o efeito do E2 neste comportamento, foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol) e foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,59)} = 17,59$; $p < 0.001$] e Tratamento com Estradiol [$F_{(3,59)} = 3,32$; $p = 0.025$] sem interação entre esses fatores.

Para avaliar o efeito da fase do estradiol no comportamento de *rearing* (Figura 8B), foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Novamente foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,59)} = 8,40$; $p = 0.005$] e Tratamento com Estradiol [$F_{(3,59)} = 3,25$; $p = 0.028$] sem interação entre esses fatores.

Para a análise efeito do estradiol na emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 8C) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,59)} = 46,59$; $p < 0.001$] quanto de tratamento com estradiol: [$F_{(3,59)} = 18,51$; $p < 0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(3,59)} = 5,08$; $p = 0.003$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono tratado com veículo teve aumento de USV's em relação ao seu controle, e que o grupo tratado com E2 10 minutos e 2 horas antes do teste apresentaram mais vocalização que os outros grupos privados de sono.

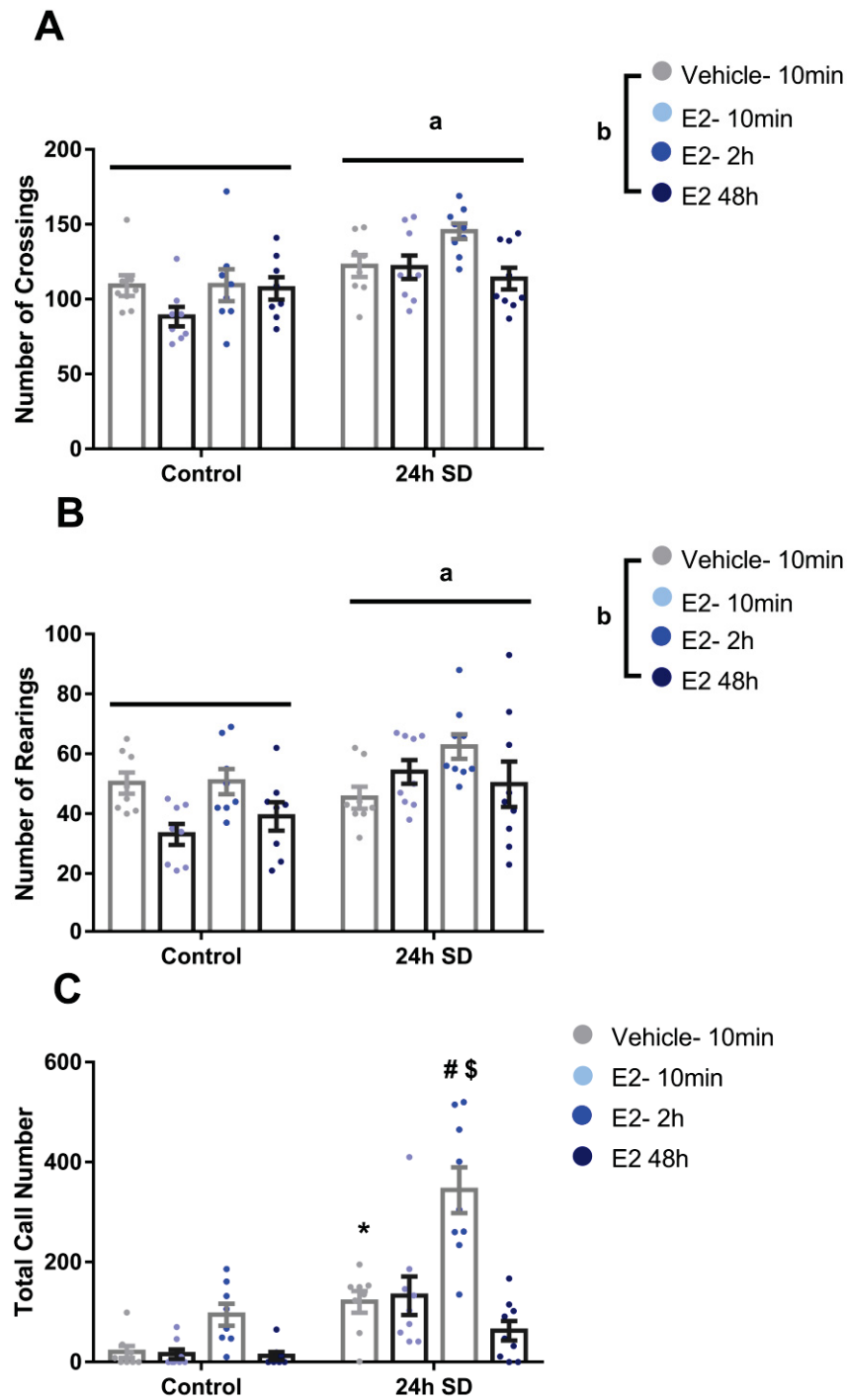


Figura 8: Curva Tempo-Resposta de tratamento com estradiol sistêmico (E2; 10 µg/kg) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM de 24h (SD). 8A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 8B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 8C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por PSREM. Os dados são expressos por média ± EPM. Control-Vehicle n=8; Control-E2 10 min n=8; Control-E2 2h n=8; Control-E2 48h n=8; SD-Vehicle n=8; SD- E2 10 min n=9; SD- E2 2h n=9; SD- E2 48h n=9. ^a= p<0.05 ≠ no fator Privação de Sono. ^b= p<0.05 ≠ no fator Tratamento com Estradiol. * = p<0.05 ≠ em relação ao grupo Control-Vehicle. # = p<0.05 ≠ em relação ao grupo SD-Vehicle. \$ = p<0.05 # de todos os outros grupos.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 2). Em relação ao tempo total de vocalização (total call time) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Estradiol). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,59)} = 28,82$; $p < 0.001$] quanto de tratamento com estradiol: [$F_{(3,59)} = 12,29$; $p < 0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(3,59)} = 2,85$; $p = 0.04$], sendo que o grupo SD tratado com E2 2 horas antes do teste apresentou um maior tempo de vocalização que os outros grupos. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) não foi observado efeito de nenhum dos fatores.

Tabela 2: Avaliação do efeito rápido vs efeito clássico do estradiol sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratas OVX privadas de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEH 10 MIN	0.22 ± 0.14	5.58 ± 2.14
CONTROL -E2 10 MIN	0.61 ± 0.53	10.85 ± 7.60
CONTROL -E2 2H	1.36 ± 0.35	13.01 ± 1.52
CONTROL -E2 48H	0.16 ± 0.11	5.85 ± 2.37
SD-VEH 10 MIN	1.60 ± 0.29	12.29 ± 1.67
SD -E2 10 MIN	1.87 ± 0.56	13.55 ± 0.86
SD -E2 2H	4.39 ± 0.65 #	13.42 ± 1.32
SD -E2 48H	0.87 ± 0.25	11.29 ± 2.26

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono; E2= estradiol. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados em negrito= estatisticamente significativos. Dados expressos por média ± DP. #= $p < 0.05$ em comparação ao grupo SD-VEHICLE. \$= $p < 0.05$ em relação a todos os outros grupos.

5.3. O SERM (modulador seletivo de receptor de estrogênio) clomifeno tem efeito sexo-dependente sobre USVs em modelo de mania por privação de sono REM em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas

5.3.1. Machos e Clomifeno

Foi avaliado o efeito do tratamento agudo com clomifeno sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em machos. Não foi observado efeito do fator privação de sono ou do clomifeno sobre a atividade locomotora (Figura 9A) ou *rearing* (Figura 9B).

Já na emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 9C) a ANOVA de 2 vias mostrou efeito do tratamento com clomifeno: [$F_{(1,33)} = 6,18$; $p=0.018$] levando ao seu aumento, mas não da privação de sono e sem interação destes fatores.

5.3.2. Fêmeas e Clomifeno

Em seguida foi avaliado o efeito do tratamento agudo com clomifeno sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em fêmeas independente da fase do ciclo estral. Não foi observado efeito do fator privação de sono ou do clomifeno sobre a atividade locomotora (Figura 10A), *rearing* (Figura 10B) ou sobre a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 10C).

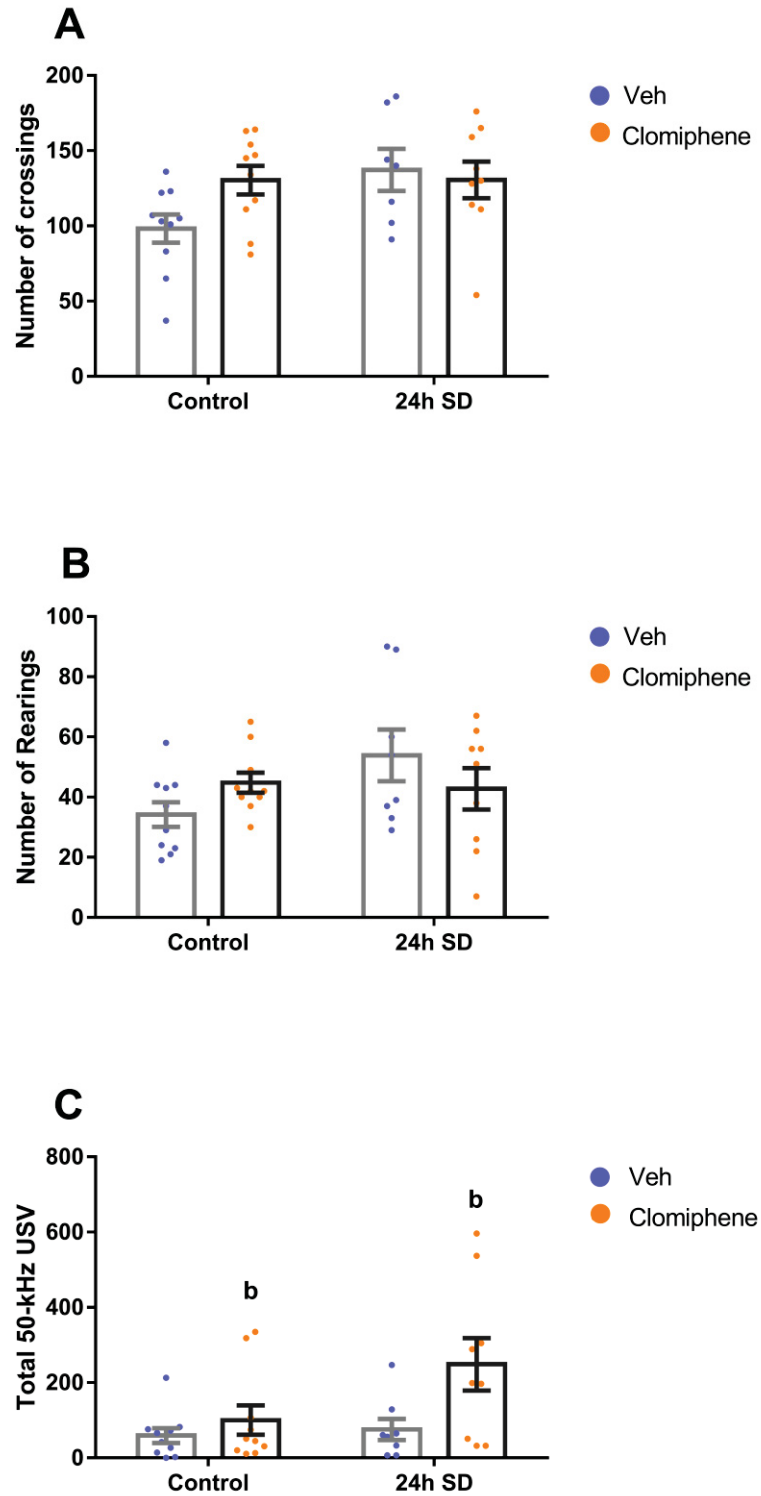


Figura 9: Efeito do tratamento com clomifeno sistêmico (Clomiphene) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM de 24h (SD) em machos. xA- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 8B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 9C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Veh, n=10; Control-Clomiphene, n=10; SD-Veh, n=8; SD-Clomiphene, n=9. b= $p < 0.05$ $\neq$ no fator Tratamento com Clomifeno.

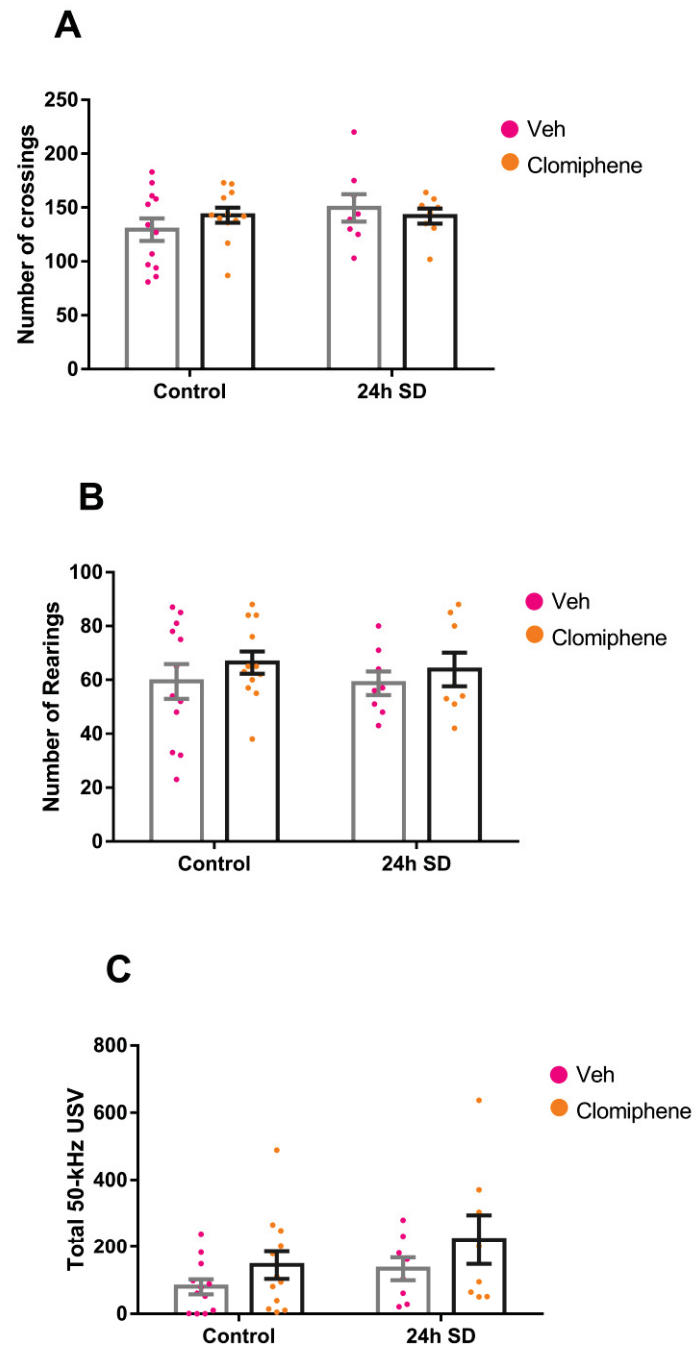


Figura 10: Efeito do tratamento com clomifeno sistêmico (Clomiphene) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em fêmeas. 10A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 10B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 10C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Veh, n=12; Control-Clomiphene, n=12; SD-Veh, n=8; SD-Clomiphene, n=8.

5.3.3. OVX e Clomifeno

Após, foi avaliado o efeito do tratamento agudo com clomifeno sobre comportamentos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas (OVX). Não foi observado efeito do fator privação de sono ou do clomifeno sobre a atividade locomotora (Figura 11A). Em relação ao *rearing* (Figura 11B), ANOVA de 2 vias não apontou efeito dos fatores privação de sono ou tratamento com clomifeno, porém mostrou haver interação entre esses dois fatores [$F_{(1,32)} = 5,90$; $p=0.021$].

Em relação a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 11C), ANOVA de 2 vias mostrou efeito do fator privação de sono [$F_{(1,32)} = 16,19$; $p<0.001$], mas não do tratamento com clomifeno, com interação entre esses dois fatores [$F_{(1,32)} = 5,16$; $p=0.03$]. Post-hoc de Newman Keuls apontou que a privação de sono levou à um aumento de USVs de 50-kHz e que o tratamento com clomifeno diminuiu esse efeito.

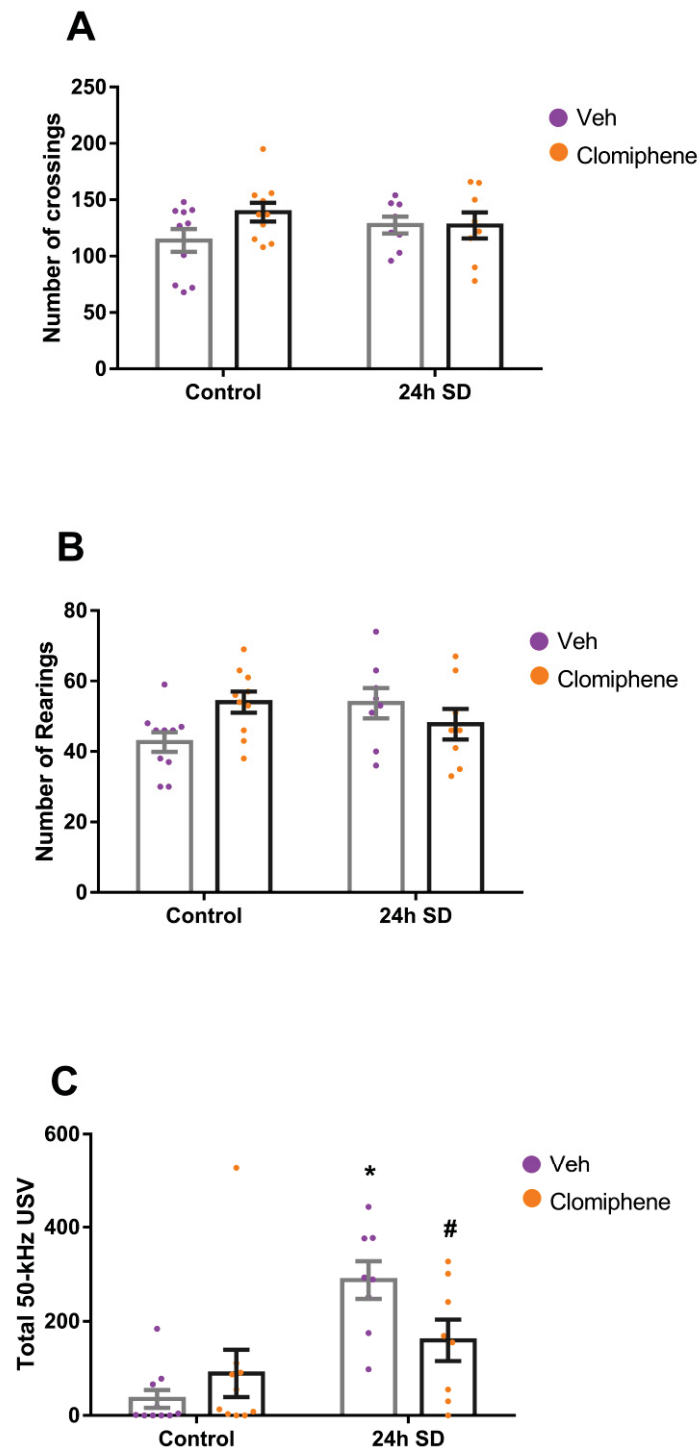


Figura 11: Efeito do tratamento com clomifeno sistêmico (Clomiphene) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em fêmeas ovariectomizadas. 11A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 11B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 11C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média ± EPM. Control-Veh, n=10; Control-Clomiphene, n=10; SD-Veh, n=8; SD-Clomiphene, n=8. *= p<0.05 ≠ em relação ao grupo Control-Veh. # = p<0.05 ≠ em relação ao grupo SD-Veh.

5.4. Diferenças sexuais e efeito do estradiol na resposta ao lítio em modelo de privação de sono

5.4.1. Machos e Lítio

Para avaliar possíveis diferenças de sexo sobre a resposta ao lítio (50 mg/kg, *i.p.*), o primeiro parâmetro comportamental avaliado foi a locomoção (Figura 12A) em machos. Foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio) e foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,36)} = 10,73$; $p=0.002$] e Tratamento com Lítio [$F_{(1,36)} = 6,99$; $p=0.01$] com interação [$F_{(1,36)} = 15,17$; $p<0.001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve um aumento da atividade locomotora e que o lítio foi capaz de reverter este efeito.

Para avaliar o efeito do lítio no comportamento de *rearing* (Figura 12B), foi feita uma ANOVA de 2 vias onde foi observado efeito do fator Tratamento com Lítio [$F_{(1,36)} = 44,44$; $p<0.001$] mas não da privação de sono. Houve interação entre esses dois fatores [$F_{(1,36)} = 24,76$; $p<0.001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve um aumento do *rearing* e que o lítio foi capaz de reverter este efeito, mas também demonstrou efeito *per se* nos animais não privados de sono.

Em relação a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 12C) a ANOVA de 2 vias mostrou efeito de privação de sono [$F_{(1,36)} = 20,20$; $p<0.001$] e apenas uma tendência no fator tratamento com lítio [$F_{(1,36)} = 3,86$; $p=0.057$] mas sem interação entre estes fatores.

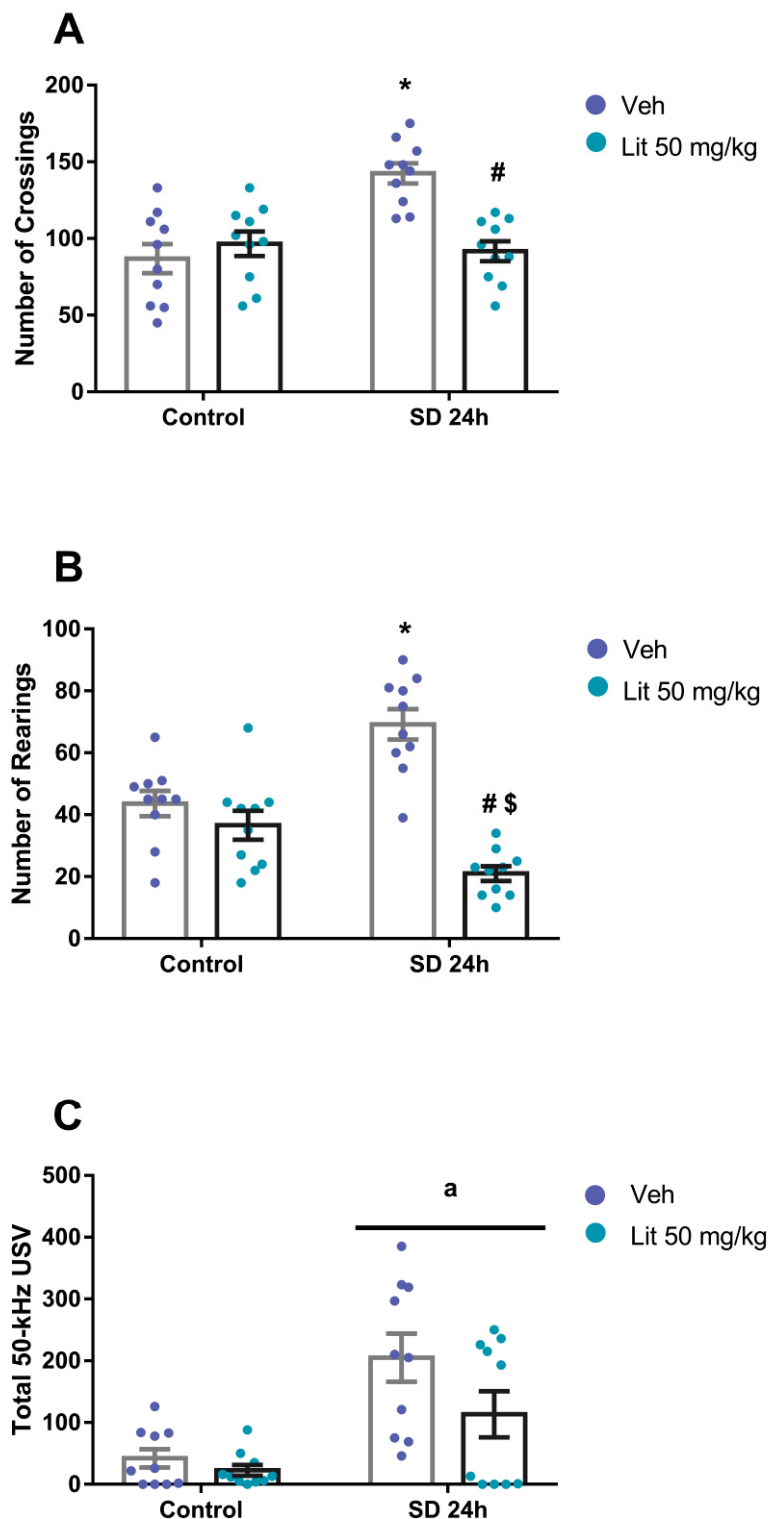


Figura 12: Efeito do tratamento com lítio agudo sistêmico (Lit 50 mg/kg) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em machos. 12A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 12B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 12C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Veh, n=10; Control-Lit, n=10; SD-Veh, n=10; SD-Lit, n=10. * = $p < 0.05$ $\neq$ em relação ao grupo Control-Veh. # = $p < 0.05$ $\neq$ em relação ao grupo SD-Veh. \$ = $p < 0.05$ $\neq$ em relação a todos os outros grupos. a = $p < 0.05$ $\neq$ no fator Privação de Sono.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 3). Em relação ao tempo total de vocalização (total call time) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio). Foi observado efeito de privação de sono [$F_{(1,36)} = 16,67$; $p=0.002$] mas não do fator lítio e sem interação entre esses fatores. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) não foi observado efeito de nenhum dos fatores.

Tabela 3: Efeito da privação de sono e do tratamento agudo com lítio sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratos machos privados de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEH	0.22 ± 0.21	14.07 ± 5.14
CONTROL -LIT 50 MG/KG	0.39 ± 0.12	27.64 ± 10.78
SD- VEH	3.49 ± 0.82^a	15.55 ± 0.99
SD- LIT 50 MG/KG	1.70 ± 0.58^a	10.45 ± 2.34

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados em negrito= estatisticamente significativos. Dados expressos por média ± EPM. ^a= $p<0.05$ no Fator Privação de Sono.

5.4.2. Fêmeas e Lítio

Em seguida, para avaliar possíveis diferenças de sexo, conteúdo hormonal sobre a resposta ao lítio, foi avaliada a locomoção (Figura 13A) em fêmeas independente da fase do ciclo estral. Foi feita uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio) e foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,36)} = 10,69$; $p=0.002$] e Tratamento com Lítio [$F_{(1,36)} = 15,78$; $p<0.01$] com interação entre os fatores [$F_{(1,36)} = 11,70$; $p=0.001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve um aumento da atividade locomotora e que o lítio foi capaz de reverter este efeito.

Para avaliar o efeito do lítio no comportamento de *rearing* (Figura 13B), foi feita uma ANOVA de 2 vias onde foi observado efeito do fator Privação de Sono: [$F_{(1,36)} = 10,93$; $p=0.002$] e Tratamento com Lítio [$F_{(1,36)} = 31,04$; $p<0.001$], havendo interação entre esses dois fatores [$F_{(1,36)} = 23,24$; $p<0.001$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve um aumento do *rearing* e que o lítio foi capaz de reverter este efeito.

Em relação a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 13C) a ANOVA de 2 vias mostrou efeito de privação de sono [$F_{(1,36)} = 9,03$; $p=0.004$] e do fator tratamento com lítio [$F_{(1,36)} = 8,54$; $p=0.005$] mas sem interação entre estes fatores.

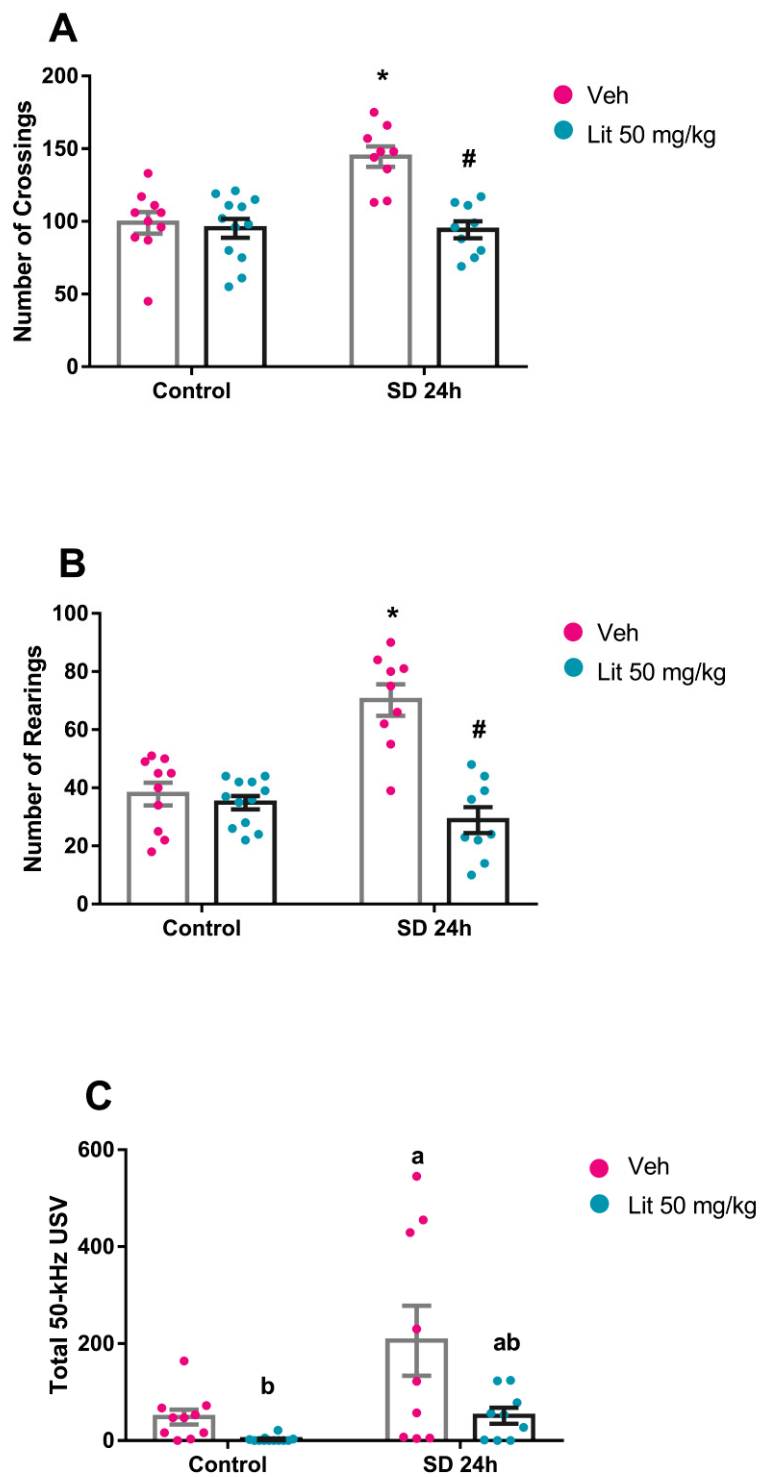


Figura 13: Efeito do tratamento com lítio agudo sistêmico (Lit 50 mg/kg) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em fêmeas. 13A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 13B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 13C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média ± EPM. Control-Veh, n=10; Control-Lit, n=12; SD-Veh, n=9; SD-Lit, n=9. * = $p < 0.05$ ≠ em relação ao grupo Control-Veh. # = $p < 0.05$ ≠ em relação ao grupo SD-Veh. a = $p < 0.05$ ≠ no fator Privação de Sono. b = $p < 0.05$ ≠ no fator Tratamento com Lítio.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 4). Em relação ao tempo total de vocalização (total call time) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,36)} = 9,04$; $p=0.005$] quanto de tratamento com lítio: [$F_{(1,36)} = 8,55$; $p=0.006$] sem interação destes fatores: [$F_{(1,36)} = 3,69$; $p=0.06$]. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) também foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,36)} = 10,37$; $p=0.003$] quanto de tratamento com lítio: [$F_{(1,36)} = 26,45$; $p<0.001$] sem interação destes fatores.

Tabela 4: Efeito da privação de sono e do tratamento agudo com lítio sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratas fêmeas privadas de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEH	0.62 ± 0.20	11.86 ± 1.47
CONTROL -LIT 50 MG/KG	0.02 ± 0.02^b	2.39 ± 1.06^b
SD- VEH	3.55 ± 1.28^a	14.78 ± 1.24^a
SD- LIT 50 MG/KG	0.67 ± 0.22^{ab}	9.01 ± 2.13^{ab}

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados em negrito= estatisticamente significativos. Dados expressos por média ± EPM. ^a= $p<0.05$ no Fator Privação de Sono. ^b= $p<0.05$ no Fator Tratamento com Lítio.

5.4.3. OVX e Lítio

Para avaliar possíveis diferenças do nível hormonal sobre a resposta ao lítio, foi avaliada a locomoção (Figura 14A), rearing (Figura 14B), e emissão de USVs de 50-kHz (Figura 14C) em fêmeas ovariectomizadas. Porém, não houve efeito dos fatores privação de sono ou tratamento com lítio nos comportamentos avaliados.

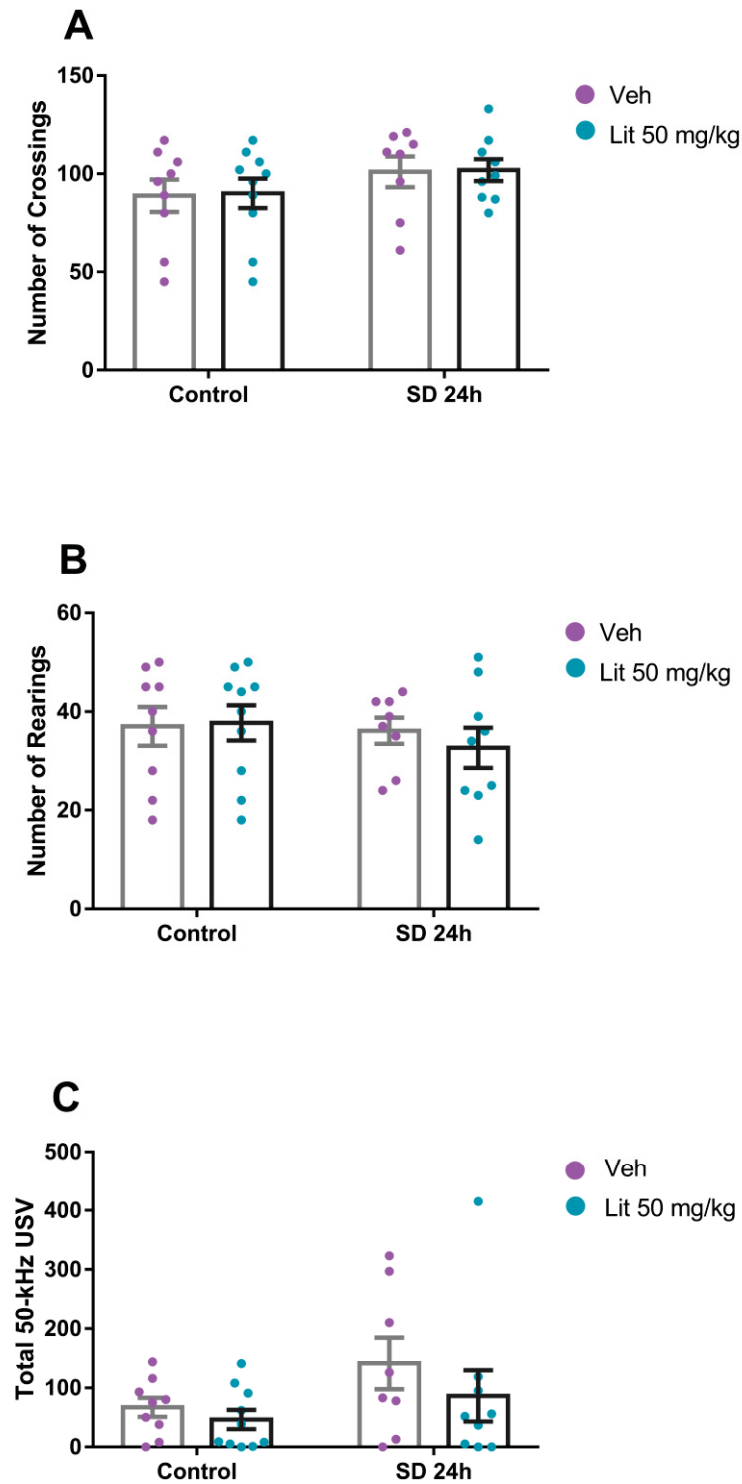


Figura 14: Efeito do tratamento com lítio agudo sistêmico (Lit 50 mg/kg) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em fêmeas ovariectomizadas. 14A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 14B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 14C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Veh, n=9; Control-Lit, n=10; SD-Veh, n=8; SD-Lit, n=9.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 5). Foram realizadas ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio) para todos os parâmetros acústicos. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) foi observado interação entre os dois fatores [$F_{(1,32)} = 5,50$; $p=0.025$] mas não de cada fator separadamente. Não foi observado diferença estatística em relação aos outros parâmetros acústicos.

Tabela 5: Efeito da privação de sono e do tratamento agudo com lítio sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratas fêmeas ovariectomizadas privadas de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEH	0.86 ± 0.22	10.84 ± 1.58
CONTROL -LIT 50 MG/KG	0.75 ± 0.27	14.37 ± 1.76
SD- VEH	2.19 ± 0.73	13.39 ± 2.03
SD- LIT 50 MG/KG	1.04 ± 0.57	8.63 ± 1.68

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados em negrito= estatisticamente significativos. Dados expressos por média ± EPM.

5.4.4. OVX+E2 e Lítio

Por último, para avaliar possíveis diferenças do nível hormonal sobre a resposta ao lítio, foi avaliada a locomoção (Figura 15A) em fêmeas ovariectomizadas (OVX) tratadas com estradiol (E2) agudamente. A ANOVA de duas vias mostrou efeito do fator privação de sono [$F_{(1,30)} = 21,63$; $p < 0.001$], mas não do tratamento com lítio, sendo observado interação entre esses dois fatores [$F_{(1,30)} = 11,92$; $p = 0.002$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve um aumento de atividade locomotora e que o lítio foi capaz de reverter este efeito.

O efeito do lítio no comportamento de *rearing* (Figura 15B), foi analisado por uma ANOVA de 2 vias em que foi observado efeito de ambos os fatores: Privação de Sono [$F_{(1,30)} = 11,03$; $p = 0.002$] e Tratamento com Lítio [$F_{(1,30)} = 9,21$; $p = 0.004$] sem interação entre esses fatores.

Para a análise efeito do lítio na emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Figura 15C) foi realizada uma ANOVA de 2 vias que mostrou efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,30)} = 7,61$; $p = 0.009$] quanto de tratamento com lítio: [$F_{(1,30)} = 21,83$; $p < 0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(1,30)} = 7,86$; $p = 0.008$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo privado de sono teve aumento de USV e que o tratamento com lítio foi capaz de reverter este efeito.

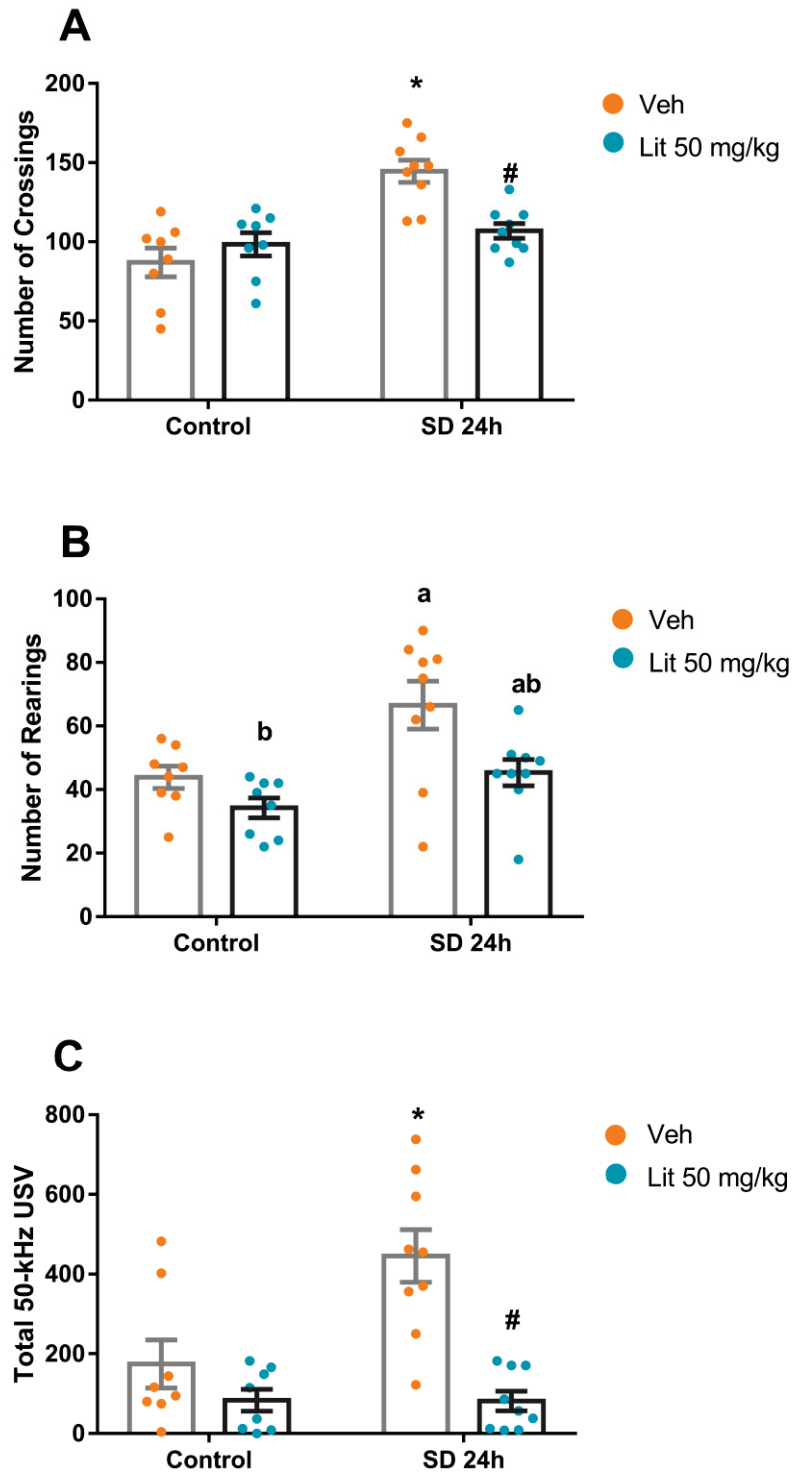


Figura 15: Efeito do tratamento com lítio agudo sistêmico (Lit 50 mg/kg) sobre comportamentos tipo maníacos induzidos por modelo de mania por privação de sono REM (SD) de 24h em fêmeas ovariectomizadas e tratadas com estradiol. 15A- número de cruzamentos em uma caixa de atividade; 15B- *rearing* (número de vezes que os animais se levantam nas patas traseiras em comportamento exploratório; 15C- Número total de USV (vocalizações ultrassônicas) na frequência de 50-kHz induzida por privação de sono REM de 24h. Os dados são expressos por média $\pm$ EPM. Control-Veh, n=8; Control-Lit, n=8; SD-Veh, n=9; SD-Lit, n=9. *= $p < 0.05$ $\neq$ em relação ao grupo Control-Veh. # = $p < 0.05$ $\neq$ em relação ao grupo SD-Veh. a = $p < 0.05$ $\neq$ no fator Privação de Sono. b = $p < 0.05$ $\neq$ no fator Tratamento com Lítio.

Por último foram avaliados os parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz (Tabela 6). Em relação ao tempo total de vocalização (total call time) foi realizada uma ANOVA de 2 vias (Fator 1: Privação de Sono; Fator 2: Tratamento com Lítio). Foi observado efeito tanto de privação de sono [$F_{(1,30)} = 7,57$; $p=0.01$] quanto de tratamento com lítio: [$F_{(3,30)} = 20,41$; $p<0.001$] com interação destes fatores: [$F_{(1,30)} = 8,89$; $p=0.005$], sendo que o grupo privado de sono tratado com veículo apresentou um maior tempo de vocalização que os outros grupos, e o tratamento com lítio foi capaz de diminuir este parâmetro. Em relação à duração média das vocalizações (average call duration) não foi observado diferença estatística.

Tabela 6: Efeito da privação de sono e do tratamento agudo com lítio sobre parâmetros acústicos das vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em ratas fêmeas ovariectomizadas e tratadas com estradiol privadas de sono

GROUP	Total Call Time [s]	Average Call Duration [ms]
CONTROL-VEH	2.74 ± 1.10	14.76 ± 1.20
CONTROL -LIT 50 MG/KG	1.40 ± 0.47	13.98 ± 2.30
SD- VEH	7.72 ± 1.19 *	17.15 ± 0.59
SD- LIT 50 MG/KG	1.20 ± 0.36 #	15.13 ± 0.78

Control= animais não privados de sono; SD= animais privados de sono. Total Call Time= tempo total que os animais passaram vocalizando durante os 10 min de teste. Average Call Duration = tempo médio de duração de cada uma das vocalizações emitidas. Dados em negrito= estatisticamente significativos. Dados expressos por média ± EPM. . *= $p<0.05$ em comparação ao grupo CONTROL-VEHICLE. #= $p<0.05$ em comparação ao grupo SD-VEHICLE.

5.5. Diferenças sexuais e efeito do estradiol, ovariectomia e privação de sono no conteúdo monoaminérgico no Núcleo Accumbens e Córtex Pré-Frontal

No núcleo accumbens (Tabela 7), ANOVA de 2 vias mostrou efeito de sexo/conteúdo hormonal [$F_{(4,59)} = 6,78$; $p < 0.001$] mas não de privação de sono: [$F_{(1,59)} = 1,87$; $p = 0.17$] com interação destes fatores: [$F_{(4,59)} = 2,54$; $p = 0.04$] no conteúdo de dopamina. *Post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que fêmeas ovariectomizadas privadas de sono apresentaram níveis de dopamina maiores que todos os outros grupos. Em relação ao *turnover* de dopamina, ANOVA de 2 vias mostrou efeito de sexo/conteúdo hormonal [$F_{(4,59)} = 12,16$; $p < 0.001$] e de privação de sono: [$F_{(1,59)} = 4,88$; $p = 0.03$] sem interação destes fatores. Quanto aos níveis de serotonina, ANOVA de 2 vias mostrou efeito de sexo/conteúdo hormonal [$F_{(4,59)} = 4,98$; $p < 0.001$] mas não de privação de sono: [$F_{(1,59)} = 2,78$; $p = 0.1$] com interação destes fatores: [$F_{(4,59)} = 2,65$; $p = 0.04$]. *Post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que fêmeas ovariectomizadas privadas de sono apresentaram níveis de serotonina maiores que todos os outros grupos. Por último, em relação à noradrenalina, ANOVA de 2 vias mostrou efeito de sexo/conteúdo hormonal [$F_{(4,58)} = 6,77$; $p < 0.001$], mas não de privação de sono, e sem interação destes fatores.

Tabela 7: Efeito diferencial sexo/hormônio dependente da privação de sono sobre os níveis de monoaminas no Núcleo Accumbens de ratos Wistar

GROUP	n/group	DA	TURNOVER DA	5-HT	NA
CONTROL-MALE	7	890± 119	9±0.4	104± 8	110± 11
SD-MALE	7	952± 63	8±1.3	114± 11	89± 11
CONTROL-DIESTRUS	8	553± 72	14±1.5	84± 11	96± 6
SD-DIESTRUS	7	650± 46	11±1.2	92± 9	99± 8
CONTROL-PROESTRUS	8	583± 63	15±1.5	65± 10	78± 9
SD-PROESTRUS	8	668± 63	12±1.1	94± 7	102± 8
CONTROL-OVX	6	1062± 156	8±0.4	112± 17	135± 16
SD-OVX	8	2152± 503*#	5±1.3	211± 42*#	157± 18
CONTROL-OVX+E2	6	1358± 373	7±1.9	145± 33	111± 12
SD-OVX + E2	5	1051± 211	8±1	112± 17	117± 11

Conteúdo de monoaminas no núcleo accumbens em ng/mg de tecido. CONTROL= animais não privados de sono. Diestrus= fêmeas ciclando normalmente em fase de Diestro I ou II no dia da coleta de tecido. Proestrus= fêmeas ciclando normalmente em fase de pró-estro ou estro no dia da coleta de tecido. SD= animais privados de sono. OVX= fêmeas ovariectomizadas. E2= Administração aguda de estradiol, 10 µg/kg. Turnover= DOPAC+HVA/DA. Dados expressos por média ± EPM. Dados em negrito = estatisticamente significativos. *=p<0.05 para o Fator Privação de Sono; #=p<0.05 para o Sexo/Hormônio.

No córtex pré-frontal (Tabela 8), ANOVA de 2 vias mostrou efeito apenas de sexo/conteúdo hormonal nos níveis de noradrenalina: [$F_{(4,64)} = 10,11$; $p<0.001$]; nos níveis de dopamina: [$F_{(4,64)} = 12,93$; $p<0.001$]; no *turnover* de dopamina: [$F_{(4,64)} = 9,30$; $p<0.001$] e nos níveis de serotonina: [$F_{(4,64)} = 8,01$; $p<0.001$]; sem efeito de privação de sono ou interação entre esses fatores.

Tabela 8: Efeito diferencial sexo/hormônio dependente da privação de sono sobre os níveis de monoaminas no Córtex Pré-Frontal de ratos Wistar

GROUP	n/group	DA	TURNOVER DA	5-HT	NA
CONTROL-MALE	7	14± 1	5±0.4	237± 20	127± 13
SD-MALE	7	15± 2	5±0.6	263± 15	141± 11
CONTROL-DIESTRUS	8	18± 1	5±0.3	184± 21	101± 10
SD-DIESTRUS	7	15± 2	6±0.8	201± 21	107± 10
CONTROL-PROESTRUS	8	23± 5	4±0.4	187± 21	96± 12
SD-PROESTRUS	8	23± 2	6±0.8	198± 16	126± 10
CONTROL-OVX	6	33± 6	2±0.5	283± 32	175± 17
SD-OVX	8	42± 4	2±0.3	330± 38	187± 21
CONTROL-OVX+E2	6	17± 2	6±1	192± 22	127± 9
SD-OVX + E2	5	21± 4	5±1	193± 38	149± 23

Conteúdo de monoaminas no córtex pré-frontal em ng/mg de tecido. CONTROL= animais não privados de sono. Diestrus= fêmeas ciclando normalmente em fase de Diestro I ou II no dia da coleta de tecido. Proestrus= fêmeas ciclando normalmente em fase de pró-estro ou estro no dia da coleta de tecido. SD= animais privados de sono. OVX= fêmeas ovariectomizadas. E2= Administração aguda de estradiol, 10 µg/kg. Turnover= DOPAC+HVA/DA. Dados expressos por média ± EPM.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho propôs avaliar o efeito do estradiol em fêmeas ovariectomizadas bem como o efeito da modulação deste receptor e diferenças sexuais apresentadas por machos e fêmeas em comportamentos do tipo maníacos, níveis de monoaminas em regiões relevantes e resposta ao lítio em modelo de mania por privação de sono REM de 24h.

Em relação ao efeito do estradiol em fêmeas ovariectomizadas, podemos ver um sumário dos resultados na tabela 9:

Tabela 9 – Sumário dos efeitos da administração de estradiol em fêmeas ovariectomizadas submetidas à privação de sono REM por 24h

	LOCOMOÇÃO	REARING	TOTAL USV	PARÂMETROS ACÚSTICOS USV
ESTRADIOL 0.1 E 1 µG/KG	=	=	=	↑
ESTRADIOL 10 µG/KG	↑	↑	↑	↑
ESTRADIOL EF. RÁPIDO	↑	↑	↑	↑
ESTRADIOL EF. CLÁSSICO	=	=	↓	↓

↓: diminuição; ↑: aumento; =: não alterado

Primeiramente foi feito um modelo de climatério/retirada de produção de hormônios sexuais endógenos, para avaliação do efeito de hormônio estradiol exógeno em modelo de mania por privação de sono REM de 24h.

Foi observado que estradiol na dose de 10 µg/kg intensifica comportamentos tipos maníacos em modelo de privação de sono REM em fêmeas ovariectomizadas. Apesar de não ter sido encontrado interação de fatores, tanto a privação de sono de 24h quanto o tratamento com estradiol foram capazes de levar a hiperlocomoção e também a um aumento de *rearing*. Foi observado também que a dose de 10 µg/kg foi estatisticamente diferente que as doses menores, capaz de não apenas exacerbar o comportamento do tipo maníaco induzido por privação de sono, mas também tendo efeito *per se*. Este efeito também foi observado na atividade exploratória avaliada pelo *rearing*.

Na literatura já foi observado que o tratamento com estradiol é capaz de induzir aumento de locomoção em fêmeas. Em fêmeas OVX, o tratamento com estradiol aumenta a atividade de corrida (MORGAN; PFAFF, 2002). Fêmeas tratadas com

estradiol exibem também uma exacerbação da atividade locomotora induzida por anfetamina (BECKER; BEER, 1986; BECKER; MOLEND; HUMMER, 2001; BECKER, 1990). Isso corrobora também com a hiperlocomoção e aumento de atividade exploratória observados em fêmeas em pró-estro (Pasquini de Souza, dados não publicados), que estão na fase de pico hormonal de estradiol. O estradiol quando administrado agudamente, portanto, influencia a atividade locomotora espontânea em ratas, e é capaz de exacerbar este efeito quando associado com um modelo de mania.

Outro efeito importante do estradiol avaliado foi sua capacidade de induzir aumento de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz em fêmeas ovariectomizadas. As vocalizações ultrassônicas de 50-kHz induzidas por modelo de mania parecem servir como um marcador para comunicação de estado afetivo que fornece um modelo útil de humor eufórico exagerado e fala pressionada (PEREIRA *et al.*, 2014). Assim como já observado em outros estudos do nosso grupo, a emissão de vocalizações ultrassônicas de 50-kHz parece mais sensível ao efeito de modelos de mania (WENDLER *et al.*, 2016) como a privação de sono de 24h (WENDLER *et al.*, 2019) e efeitos hormonais (Pasquini de Souza, dados não publicados) do que outros parâmetros avaliados relacionados ao comportamento do tipo maníaco.

De fato, o estradiol administrado agudamente na dose de 10 µg/kg levou a uma exacerbação da emissão de 50-kHz, efeito este que pode ser observado não apenas através do número total de vocalizações emitidas pelos animais durante o período de teste, mas também por outros parâmetros acústicos relacionados, como o tempo total em que o animal passou vocalizando. Por exemplo, animais privados de sono e tratados com E2 10 µg/kg chegou a ser em média, 3 vezes maior que os animais privados de sono tratados com veículo e quase 30 vezes maior que os animais controle. Além disso, foi observado que animais tratados com estradiol agudamente, independentemente da dose tiveram a média de duração de suas vocalizações individuais sendo o dobro que a média dos animais controle, efeito esse que também foi visto em animais privados de sono. Vocalizações de 50-kHz são uma classe complexa de USV que apresentam espectogramas distintos e que podem ser classificados em diversos subtipos diferentes. Estudos já mostraram que as vocalizações de 50 kHz estão relacionadas a situações comportamentais positivas e podem ser aumentadas por estímulos hedônicos gratificantes (BRUDZYNSKI, 2015). No entanto, parece haver uma diferença no contexto em que as vocalizações são

emitidas. Enquanto as USVs de 50-kHz chamadas de frequência modulada são associadas a situações altamente gratificantes e de excitação emocional, as do tipo *flat* parecem ter papel de comunicação social (BURGDORF *et al.*, 2007; BURGDORF; PANKSEPP; MOSKAL, 2011; KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 2002). Vocalizações frequência modulada como as do tipo *trill* costumam ser mais longas que as *flat*, então o fato que estes animais tiveram uma média de duração de suas USVs mais longa, indica que houve uma mudança também no perfil de subtipo de USVs emitidas por eles, efeito esse induzido tanto pela privação de sono quanto pela administração de estradiol. Podemos observar que apesar de haver um efeito apenas do modelo, esse efeito é bem mais pronunciado quando associado à administração de E2, havendo interação entre esses dois fatores. O estradiol nessa dose portanto demonstra capacidade de exacerbar o comportamento tipo maníaco neste modelo de privação de sono.

O próximo passo foi avaliar se haveria efeito tanto rápido, através de receptores de membrana, quanto genômico, com maior latência, do estradiol em exacerbar comportamentos do tipo maníacos induzidos por privação de sono REM. É bem conhecido que muitas das ações do E2 no sistema nervoso central são mediadas por receptores intracelulares/fatores de transcrição que interagem com elementos de resposta a esteróides em genes-alvo. Também se sabe que o E2 pode alterar rapidamente a atividade neuronal em segundos, indicando que alguns efeitos celulares podem ocorrer por meio de eventos delimitados por membrana. Além disso, E2 pode afetar os sistemas de segundos mensageiros, incluindo a mobilização de cálcio e uma infinidade de quinases para alterar a sinalização celular, o que constitui uma outra ação rápida deste hormônio (KELLY; RØNNEKLEIV, 2008).

Neste experimento de curva temporal, mais uma vez foi observado efeito de hormônio estradiol e de privação de sono de 24h levando à hiperlocomoção e aumento de rearing, apesar de não haver interação entre estes fatores. Em relação ao estradiol, se observa que a administração deste hormônio no tempo de 2h antes do teste levou a efeitos do tipo maníacos mais pronunciados do que qualquer outro tempo. O estradiol modula rapidamente a liberação de dopamina pela ligação aos receptores de estradiol da membrana (BECKER, 2005; MERMELSTEIN, 2009; MORISSETTE *et al.*, 2008) e está altamente relacionado com comportamentos motivados (YOEST; CUMMINGS; BECKER, 2014). Nesta linha, o aumento da transmissão Daminérgica tem sido associada à mania (ASHOK *et al.*, 2017).

O efeito de tratamento com estradiol nesta curva dose resposta, foi mais proeminente quando avaliada a emissão de USVs de 50-kHz. Aqui podemos ver que apesar de haver efeito do modelo de privação de sono *per se* levando ao aumento de USVs em relação ao controle, este efeito é bastante exacerbado quando administrado estradiol 2h antes do teste. Este efeito também foi observado em relação à parâmetros acústicos, como o tempo total de emissão de USVs que foi maior no grupo tratado com estradiol 2h antes do teste do que qualquer outro grupo e também em relação a frequência média das USVs que neste grupo parecia ser mais elevada que nos outros, mostrando uma tendência a modulação de frequência, fator esse que pode estar associado ao estado tipo eufórico do animal. A administração de estradiol 10min antes do teste não pareceu ter efeito, já que este grupo apresentou uma emissão de USVs de 50-kHz parecida com os animais controle. Apesar de ser um tempo curto de administração, já foi observado efeito em testes comportamentais após 15 min da administração subcutânea em baixas doses de E2, como por exemplo no teste de reconhecimento social, (PHAN *et al.*, 2012). Na literatura já é bem descrito que estrogênios afetam alguns comportamentos em tempos de 15-35 min após a administração um tempo consistente com seus efeitos não genômicos, na eletrofisiologia neuronal e nas cascatas de sinalização celular (FOY *et al.*, 1999; SMEJKALOVA; WOOLLEY, 2010; ZHAO; BRINTON, 2007). O E2 administrado a machos de várias espécies aumentou o comportamento sexual e a agressividade neste curto intervalo de tempo (CHARLIER *et al.*, 2010; CORNIL *et al.*, 2006). Outros estudos também examinaram os efeitos rápidos do estrogênio na consolidação da memória. A administração de 17 β - e 17 α -estradiol imediatamente (mas não 45 min ou 2 h) após a aquisição de aprendizagem em uma tarefa de reconhecimento de objetos e aprendizagem espacial melhorou o desempenho 4-48 h depois, apoiando um papel facilitador dos estrogênios na consolidação da memória (FERNANDEZ *et al.*, 2008; GRESACK; FRICK, 2006; INAGAKI; GAUTREAUX; LUINE, 2010). Os efeitos rápidos do estradiol sobre receptores ER α parecem ser mediados principalmente pela transativação de receptores metabotrópicos de glutamato (BOULWARE *et al.*, 2005).

Interessantemente, a administração de estradiol 48h antes do experimento não levou a exacerbação dessas vocalizações. De fato, este grupo não foi diferente do grupo controle não privado de sono, mostrando então que a administração de estradiol neste período e possivelmente a ativação genômica destes receptores não levam ao mesmo efeito de exacerbação do comportamento do tipo maníaco

observado com a administração de estradiol nos outros tempos avaliados. A falta de efeito da administração de estradiol 48h antes do teste sobre os comportamentos observados pode estar relacionado com o priming induzido por estradiol, em que o efeito genômico de E2 leva ao aumento de expressão de receptores de outro transmissor, porém havendo a necessidade de administração de um segundo hormônio para se beneficiar da ação deste priming. Um estudo com modelo de epilepsia em ratas ovariectomizadas, por exemplo, mostrou que estrogênio pode ter efeitos anticonvulsivantes, aumentando a formação de alopregnanolona, mas para isso era necessário a administração de progesterona 48h após a administração do estradiol para se atingir tal efeito (FRYE; RHODES, 2005).

Este priming induzido pela administração de estradiol também pode ser observada em outras situações, não apenas ligadas à expressão de receptores de progesterona. Por exemplo, foi observado que após 3 dias de priming de estradiol visando imitar artificialmente o proestro de fêmeas com alto teor de estradiol, a locomoção e a liberação de DA são potencializadas após uma injeção aguda de estradiol e anfetamina (BECKER; RUDICK, 1999). Talvez, utilizando-se um outro modelo de mania, como a administração de psicoestimulantes, este efeito genômico do estradiol poderia ter sido detectado. Alternativamente, a falta de efeito do estradiol administrado 48h antes do teste poderia ser devido ao término do efeito agudo do estradiol associado à ausência de efeito genômico nos comportamentos tipo maníacos avaliados.

Porém, receptores para estradiol não estão presentes apenas em fêmeas. A visão clássica das ações do estrogênio no cérebro costumava se limitar à regulação da ovulação e do comportamento reprodutivo nas fêmeas de todas as espécies de mamíferos estudadas, incluindo os humanos. Evidências crescentes documentam importantes efeitos dos estrogênios no aprendizado, memória e humor, bem como nos processos neurodegenerativos e de desenvolvimento neurológico. A maioria dos dados vem de estudos em mulheres e fêmeas, mas há um crescente reconhecimento de que os estrogênios desempenham papéis importantes no cérebro masculino, onde podem ser produzidos a partir de testosterona circulante por enzimas aromatase locais ou sintetizados *de novo* por neurônios e glia (GILLIES; MCARTHUR, 2010).

Sendo assim, foi avaliado o efeito de um modulador seletivo de receptor de estrogênio (SERM) clomifeno em machos, fêmeas e fêmeas ovariectomizadas. Foi

observado que o efeito do clomifeno sobre comportamentos tipo maníacos foi sexo dependente e dependente dos níveis de estrógeno presentes nos animais teste.

Tabela 10- Sumário dos efeitos do Clomifeno sobre modelo de mania por privação de sono em machos, fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas com reposição aguda de estradiol

CLOMIFENO	LOCOMOÇÃO	REARING	TOTAL USV
MACHOS	=	=	↑
FÊMEAS	=	=	=
OVX	=	=	↓

↓: diminuição; ↑: aumento; =: não alterado

A dose utilizada para administração aguda foi de 3 mg/kg (PEREIRA *et al.*, 2011), anteriormente usada no laboratório em camundongos em outro modelo de mania. Outros estudos observaram em ratos efeitos sexo dependente do clomifeno em modelo de convulsão numa dose semelhante (NICOLETTI *et al.*, 1985). Neste estudo, em relação a atividade locomotora e exploratória dos animais, o tratamento com clomifeno agudo não levou a efeitos maníacos ou antimaníacos em machos, fêmeas ou fêmeas ovariectomizadas. O tamoxifeno, um inibidor da proteína quinase C (PKC) e droga antiestrogênica, tem efeitos clínicos antimaníacos e bloqueia a hiperlocomção induzida por psicoestimulantes. A medroxiprogesterona (MPA), que possui efeitos estrogênicos, também exerce alguns benefícios clínicos em pacientes maníacas do sexo feminino (KULKARNI *et al.*, 2006) e bloqueia parcialmente hiperlocomção induzida por anfetaminas em alguns estudos (SABIONI *et al.*, 2008), indicando que o efeito antiestrogênico do tamoxifeno pode contribuir para o seu efeito antimaníaco. Porém, já foi observado que o tratamento com clomifeno não alterou a hiperlocomção induzida pelo psicoestimulante metilfenidato em camundongos machos, um outro modelo de comportamento tipo maníaco (PEREIRA *et al.*, 2011). Essa falta de efeitos na atividade locomotora parece corroborar com os dados observados neste trabalho, desta vez também em ratas fêmeas e fêmeas ovariectomizadas.

Em machos podemos ver que apesar de não ter havido efeito do modelo de privação de sono de 24h nesta coorte, foi possível observar efeito do tratamento com

clomifeno na emissão de USVs de 50-kHz, levando a um aumento destas vocalizações. O efeito de moduladores seletivos de receptor de estrogênio, como o clomifeno, sobre a emissão de vocalização ultrassônicas ainda não havia sido demonstrado até o presente estudo. Como já mencionado anteriormente, a emissão de vocalizações ultrassônicas parece ser um índice de euforia e afeto positivo mais sensível a efeitos de hormônios sexuais do que a atividade locomotora, comportamento mais comumente avaliado em testes de mania.

Como foi observado um aumento da emissão de 50-kHz induzido por clomifeno em machos, efeito este também observado com a administração de estradiol em fêmeas OVX, sugerindo que em machos o efeito do clomifeno nessa dose foi de agonista de receptores de estrogênio e não antagonista. Na literatura já foi observado que o clomifeno exibe um efeito duplo: ação agonista em situações de baixo nível de estradiol e ação agonista parcial em situação de alta concentração de estradiol através de ação em ER α (KUROSAWA *et al.*, 2010). Um estudo que avaliou a resposta eletroencefalográfica de ratos machos à administração aguda de clomifeno (KAUR; MANGAT, 1980) observou com dose de 4 mg/kg uma resposta inicialmente excitatória e posteriormente inibitória deste fármaco, relacionado com um possível efeito duplo estrogênico e antiestrogênico do clomifeno.

O passo seguinte foi avaliar o efeito de um SERM em fêmeas, já que o efeito do clomifeno é sexo dependente e parece depender também dos níveis de estradiol presentes no animal (KUROSAWA *et al.*, 2010). Porém, o que foi visto é que em fêmeas ciclando normalmente, tal efeito de aumento de emissões ultrassônicas de 50-kHz não foi observado. Já foi observado que a emissão de 50-kHz USV em fêmeas é dependente de fase do ciclo estral, sendo que em fases de alta de estradiol (pró-estro e estro) essa emissão é exacerbada, quando comparada com o diestro, por exemplo (Pasquini de Souza, dados não publicados). Não ter sido observado qualquer efeito do clomifeno sobre as 50-kHz USV em fêmeas é interessante pois pode refletir o efeito de diversas fases do ciclo estral e backgrounds hormonais diferentes diluindo um possível efeito agonista ou antagonista do clomifeno ao agrupá-las sem levar em consideração sua fase de ciclo estral.

Por último, foi observado um efeito oposto sobre as 50-kHz USV induzidas por clomifeno em fêmeas ovariectomizadas quando comparadas com o efeito visto em machos. O clomifeno em fêmeas OVX levou a uma atenuação da emissão de USVs, ao contrário do observado em machos, em que o clomifeno levou a um aumento das

mesmas. Embora pudesse ser esperado um padrão similar de resposta de machos e fêmeas OVX pela ausência de estradiol, os resultados divergentes poderiam ser explicados pelas influências do estradiol nas fêmeas durante todo o desenvolvimento e vida adulta, acarretando diferenças duradouras mesmo na ausência do estradiol.

Sendo observados tanto efeito do estradiol sobre o modelo de mania por privação de sono e o efeito diferencial de sexo e ovariectomia na ação de um fármaco SERM como o clomifeno, fica claro a importância de hormônios sexuais sobre o comportamento tipo maníaco em modelo animal. O último passo então foi avaliar o efeito dessas diferenças sexuais na indução do comportamento tipo maníaco e sua reversão em ratos, utilizando para isso a validação do modelo de mania por privação de sono REM com administração de lítio.

Tabela 11- Sumário dos efeitos do Lítio sobre modelo de mania por privação de sono em machos, fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e ovariectomizadas com reposição aguda de estradiol

PRIVAÇÃO DE SONO	LOCOMOÇÃO	REARING	TOTAL USV
MACHOS	↑	↑	↑
FÊMEAS	↑	↑	↑
OVX	=	=	=
OVX + E2	↑	↑	↑↑↑

LÍTIO	LOCOMOÇÃO	REARING	TOTAL USV
MACHOS	↓	↓	=
FÊMEAS	↓	↓	↓
OVX	=	=	=
OVX + E2	↓	↓	↓

↓: diminuição; ↑: aumento; =: não alterado

O lítio é um antimaníaco e estabilizador de humor clássico tanto no tratamento agudo da mania como na manutenção do TB, sendo comumente utilizado nos estudos pré-clínicos como controle positivo em desenhos experimentais. A privação de sono como modelo de mania foi validada através do tratamento com o lítio (GESSA *et al.*,

1995) e já foi observado que o lítio é capaz de atenuar as vocalizações de 50-kHz induzidas por privação de sono (Wendler, 2016). Já foi observado que o lítio na dose de 50mg/kg e 100 mg/kg (CAPPELIEZ; WHITE, 1981; FREY *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2014) são capazes de atenuar a hiperlocomoção induzida por anfetamina, mas doses de até 300 mg/kg (TOMASIEWICZ *et al.*, 2006) já foram utilizadas para se reverter completamente o aumento de locomoção induzido por anfetamina.

Inicialmente, a dose escolhida para a reversão do comportamento tipo maníaco neste estudo havia sido a de 100 mg/kg, já anteriormente utilizada no nosso laboratório em modelos de mania em ratos (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2016), inclusive com o modelo de mania por privação de sono (WENDLER *et al.*, 2019). Porém foi observado efeito *per se* dessa dose em fêmeas (dados não mostrados), o que fez com que uma nova dose fosse testada.

Com a administração de lítio na dose de 50 mg/kg foi possível observar diferenças de sexo em relação à reversão do comportamento tipo maníaco induzido pelo modelo. Em machos, a administração de lítio nessa dose foi capaz de reverter a hiperlocomoção e aumento de atividade exploratória caracterizada pelo rearing, demonstrando então seu efeito antimaníaco clássico. Porém este efeito não foi observado na emissão de 50-kHz exacerbada pelo modelo de mania; a falta de efeito do lítio também foi observada em parâmetros acústicos das vocalizações, como o tempo total de vocalização e no tempo médio de cada vocalização emitida pelos animais. Isso pode estar relacionado com a dose de lítio utilizada neste experimento, pois outras doses haviam mostrado ser eficazes em atenuar a emissão de 50-kHz USV em machos, inclusive utilizando este mesmo modelo.

Já em fêmeas ciclando normalmente foi possível observar atenuação de comportamentos tipo maníacos por lítio na dose de 50 mg/kg na hiperlocomoção, rearing e também na emissão de vocalizações de 50-kHz. O lítio nessa dose mostrou efeito também sobre parâmetros acústicos das vocalizações de 50-kHz como o tempo total de USV e a duração média delas, apesar de não ter sido observada interação entre os fatores privação de sono e tratamento com lítio. Já nas fêmeas ovariectomizadas não foi observado efeito de privação de sono ou de tratamento com lítio. Em fêmeas ovariectomizadas com reposição de estradiol, porém, tanto efeito da privação de sono quanto de lítio foram observados em geral; a privação de sono neste grupo de animais levando a hiperlocomoção, aumento de

rearing e de emissão de 50-kHz, efeitos comportamentais esses que foram revertidos pela administração aguda de lítio.

Por último foi avaliado o efeito de diferenças de sexo, ovariectomia e administração de estradiol sobre o modelo de mania por privação de sono sobre os níveis de monoaminas no córtex pré-frontal e núcleo accumbens de ratos Wistar. Foi observado efeito de sexo/ovariectomia/estradiol nos níveis de dopamina (e de seu turnover), de serotonina e noradrenalina em ambas as áreas cerebrais avaliadas, mas em geral sem efeito do fator privação de sono. A privação do sono, de forma semelhante aos psicoestimulantes (isto é, anfetaminas), também leva à hiperatividade das vias mesolímbicas dopaminérgicas (BERRO *et al.*, 2014; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2013). No entanto, enquanto a anfetamina aumenta o nível de dopamina na fenda sináptica, a privação de sono aumenta a sensibilidade do receptor dopaminérgico (LIMA *et al.*, 2008; NUNES JÚNIOR; TUFIK; NOBREGA, 1994). Nosso grupo já observou que a privação de sono aguda não produz um estado de alta liberação de dopamina na fenda sináptica como ocorre em outros modelos de mania, mas sim uma diminuição dos níveis de dopamina no estriado ventral e um estado de aumento do turnover de DA, (WENDLER *et al.*, 2019).

Diferenças sexuais já foram observadas nos níveis de monoaminas em áreas mesolímbicas seguido da administração de anfetaminas (BECKER; MOLEND; HUMMER, 2001; MA; RESENDEZ; ARAGONA, 2014). Fêmeas em geral apresentam níveis maiores de dopamina e seus metabólitos após administração aguda destas drogas, o que parece estar correlacionado com, por exemplo, uma hipersensibilidade em fêmeas aos efeitos de estimulação locomotora em comparação aos machos (PALENICEK *et al.*, 2005).

Além disso, já é bem estabelecido que o estradiol é capaz de aumentar a liberação fásica de dopamina em áreas mesolímbicas como o accumbens (YOEST; QUIGLEY; BECKER, 2018). O estradiol, tanto em fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e machos é capaz de aumentar a densidade de receptores dopaminérgicos estriatais em até 20%. Importaneamente, a ovariectomia é capaz de sensibilizar os animais à estereotipia induzida por apomorfina, e a administração de estradiol nestes animais atenua este efeito (HRUSKA *et al.*, 1982). Este efeito corrobora nossos resultados, em que observamos que fêmeas ovariectomizadas pareceram mais susceptíveis à um desbalanço dopaminérgico induzido pelo modelo de privação de sono, e que a administração de estradiol conseguiu atenuar este efeito.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo ao se avaliar comportamentos diferentes (locomotor/exploratório e USVs de 50-kHz) levando em consideração sexo e estradiol, foi possível observar que há diferenças entre machos e fêmeas, fêmeas ovariectomizadas e aquelas com reposição de estradiol não apenas na locomoção, *rearing* mas principalmente na emissão de vocalizações de 50-kHz. O estudo pré-clínico com fêmeas é limitado, e frequentemente se evita utilizá-las para não precisar lidar com flutuação hormonal no ciclo estral, não precisar aumentar o *n* do estudo, ou por simplesmente achar que não haverá diferenças entre machos e fêmeas no *endpoint* comportamental avaliado. Entretanto, foi observado que existem parâmetros comportamentais como as USV de 50-kHz que são influenciados por flutuação hormonal em fêmeas e sofrem efeitos importantes de hormônios sexuais. Esses comportamentos são importantes e devem ser investigados mais profundamente para se entender melhor a interação de hormônios sexuais com as vias de sinalização relacionadas a neurobiologia do episódio maníaco do TB, o que também aumentaria a translação dos resultados para a clínica.

REFERÊNCIAS

- ABRIAL, E. *et al.* Protein Kinase C Inhibition Rescues Manic-Like Behaviors and Hippocampal Cell Proliferation Deficits in the Sleep Deprivation Model of Mania. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. pyu031–pyu031, 2015. Disponível em: <http://ijnp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ijnp/pyu031>.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [S. l.: s. n.], 2013-. ISSN 2317-1782. Disponível em: http://encore.llu.edu/iii/encore/record/C__Rb1280248__SDSM-V__P0,2__Orightresult__X3;jsessionid=ABB7428ECBC4BA66625EDD0E0C5AAFA5?lang=eng&suite=cobalt%5Cnhttp://books.google.com/books?id=ElbMlwEACAAJ&pgis=1.
- ANDREAZZA, Ana Cristina *et al.* Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 516–524, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982174>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- ARMANI, Fernanda; ANDERSEN, Monica Levy; GALDURÓZ, José Carlos Fernandes. Tamoxifen use for the management of mania: a review of current preclinical evidence. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 231, n. 4, p. 639–649, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441937>. Acesso em: 4 jan. 2018.
- ARNOLD, Lesley M. Gender differences in bipolar disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 595–620, 2003.
- ARONICA, S M; KRAUS, W L; KATZENELLENBOGEN, B S. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 91, n. 18, p. 8517–8521, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078914>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- ASHOK, A H *et al.* The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 666–679, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2017.16>.
- BAEZA, I. *et al.* Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature

aging of the nervous and immune systems. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 219, n. 1–2, p. 90–99, 2010. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20096467>. Acesso em: 1 mar. 2018.

BARBINI, Barbara *et al.* Sleep loss, a possible factor in augmenting manic episode.

Psychiatry Research, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 121–125, 1996.

BEAULIEU, Jean-Martin; GAINETDINOV, Raul R.; CARON, Marc G. The Akt–GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 166–172, 2007. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349698>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BECKER, Jill B. Direct effect of 17 β -estradiol on striatum: Sex differences in dopamine release. **Synapse**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 157–164, 1990. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2309159>. Acesso em: 9 jan. 2018.

BECKER, Jill B. Rapid Effects of Estradiol on Motivated Behaviors. *In*: HORMONES AND THE BRAIN. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 155–172. *E-book*. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/3-540-26940-1_9. Acesso em: 1 mar. 2018.

BECKER, J B; BEER, M E. The influence of estrogen on nigrostriatal dopamine activity: behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 27–33, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3954864>. Acesso em: 29 jan. 2018.

BECKER, J B; MOLEND, H; HUMMER, D L. Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 937, p. 172–187, 2001. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458536>. Acesso em: 29 jan. 2018.

BECKER, Jill B.; RUDICK, Charles N. Rapid Effects of Estrogen or Progesterone on the Amphetamine-Induced Increase in Striatal Dopamine Are Enhanced by Estrogen Priming: A Microdialysis Study. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 53–57, 1999.

BEHL, Christian. Oestrogen as a neuroprotective hormone. **Nature reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 433–442, 2002. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042878>. Acesso em: 28 jan. 2018.

BENMANSOUR, Saloua *et al.* Impact of ovarian hormones on the modulation of the

serotonin transporter by fluvoxamine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 555–564, 2009.

BERRO, Laís F. *et al.* Relationships between sleep and addiction: The role of drug-environment conditioning. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 374–376, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468577>. Acesso em: 22 ago. 2017.

BLEHAR, M C *et al.* Women with bipolar disorder: findings from the NIMH Genetics Initiative sample. **Psychopharmacology bulletin**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 239–243, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9803748>. Acesso em: 6 jul. 2016.

BORTA, A.; WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K.W. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 166, n. 2, p. 271–280, 2006.

BOULWARE, Marissa I. *et al.* Estradiol Activates Group I and II Metabotropic Glutamate Receptor Signaling, Leading to Opposing Influences on cAMP Response Element-Binding Protein. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 20, p. 5066–5078, 2005. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/25/20/5066>. Acesso em: 13 ago. 2022.

BRUDZYNSKI, Stefan M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance , Call Classification and Neural Substrate. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 180–192, 2015. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4598430/](http://pmc/articles/PMC4598430/). Acesso em: 6 maio 2021.

BURGDORF, Jeffrey *et al.* Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 182, n. 2, p. 274–283, 2007.

BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak. Tickling induces reward in adolescent rats. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 167–173, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003193840000411X>. Acesso em: 29 jul. 2018.

BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak; MOSKAL, Joseph R. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, [s. l.], v.

35, n. 9, p. 1831–1836, 2011. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763410002009>. Acesso em: 12 set. 2017.

CAPPELIEZ, P; WHITE, N. Lithium induces dose-related increases and decreases in activity levels in the rat. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 34–38, 1981.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6785787>. Acesso em: 29 jan. 2018.

CHALECKA-FRANASZEK, E; CHUANG, D M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 15, p. 8745–8750, 1999. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411946>. Acesso em: 28 jan. 2018.

CHARLIER, Thierry D. *et al.* Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1800, n. 10, p. 1094–1105, 2010.

CIPRIANI, Andrea; RENDELL, Jennifer M; GEDDES, John. Haloperidol alone or in combination for acute mania. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], n. 3, p. CD004362, 2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16856043>. Acesso em: 1 mar. 2018.

CIRILLO, Patricia Carvalho *et al.* Bipolar disorder and Premenstrual Syndrome or Premenstrual Dysphoric Disorder comorbidity: a systematic review. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 467–479, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429819>. Acesso em: 28 jan. 2018.

COFFEY, Kevin R.; MARX, Russell G.; NEUMAIER, John F. DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations.

Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 859–868, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>. Acesso em: 19 fev. 2021.

CORNIL, Charlotte A. *et al.* Estradiol rapidly activates male sexual behavior and affects brain monoamine levels in the quail brain. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 166, n. 1, p. 110–123, 2006.

DA SILVA MOREIRA, Sonia Fatima *et al.* Hypoestrogenism alters mood: Ketamine reverses depressive-like behavior induced by ovariectomy in rats. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 109–115, 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2015.06.009>. Acesso em: 22 jul. 2016.

DALTON, K. Menstruation and acute psychiatric illnesses. **British medical journal**, [s. l.], v. 1, n. 5115, p. 148–149, 1959. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13618579>. Acesso em: 28 jan. 2018.

DEWING, Phoebe *et al.* Protein kinase C signaling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates sexual receptivity in female rats. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 12, p. 5934–5942, 2008.

DIFLORIO, Arianna; JONES, Ian. Is sex important? Gender differences in bipolar disorder. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 437–452, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047158>.

FERNANDEZ, Stephanie M. *et al.* Estradiol-Induced Enhancement of Object Memory Consolidation Involves Hippocampal Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Membrane-Bound Estrogen Receptors. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 28, n. 35, p. 8660–8667, 2008. Disponível em:

<https://www.jneurosci.org/content/28/35/8660>. Acesso em: 14 ago. 2022.

FOY, M. R. *et al.* 17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 925–929, 1999. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.1999.81.2.925>. Acesso em: 16 ago. 2022.

FREY, Benicio N *et al.* Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 326–332, 2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951735>. Acesso em: 6 jul. 2016.

FREY, Benicio N.; DIAS, Rodrigo S. Sex hormones and biomarkers of neuroprotection and neurodegeneration: Implications for female reproductive events in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 48–57, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24206266>. Acesso em: 28 jan. 2018.

FRYE, Cheryl A.; RHODES, Madeline E. Estrogen-priming can enhance progesterone's anti-seizure effects in part by increasing hippocampal levels of allopregnanolone. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 907–916, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16085296/>. Acesso em: 13 ago. 2022.

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

em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040417>. Acesso em: 28 jan. 2018.

GERRITS, Marjolein *et al.* Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the PVN of ovariectomized rats. **Brain research bulletin**, [s. l.], v. 67, n. 1–2, p. 147–155, 2005. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923005002303>. Acesso em: 29 jan. 2018.

GESSA, Gian Luigi *et al.* Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania.

European Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 5, n. SUPPL. 1, p. 89–93, 1995.

GILLIES, Glenda E.; MCARTHUR, Simon. Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines.

Pharmacological Reviews, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 155, 2010. Disponível em:

[/pmc/articles/PMC2879914/](http://pmc/articles/PMC2879914/). Acesso em: 14 ago. 2022.

GLASS, Christopher K. Differential Recognition of Target Genes by Nuclear Receptor Monomers, Dimers, and Heterodimers*. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 391–407, 1994. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8076589>. Acesso em: 28 jan. 2018.

GOODE, N *et al.* Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 267, n. 24, p. 16878–16882, 1992. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324914>. Acesso em: 28 jan. 2018.

GRANDE, Iria *et al.* Bipolar disorder. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10027, p. 1561–1572, 2016. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00241-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00241-X).

Acesso em: 14 set. 2017.

GRESACK, Jodi E.; FRICK, Karyn M. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 112–119, 2006.

HAHN, C G; FRIEDMAN, E. Abnormalities in protein kinase C signaling and the pathophysiology of bipolar disorder. **Bipolar disorders**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 81–86, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252663>. Acesso em: 28 jan. 2018.

HARRISON, Paul J; GEDDES, John R; TUNBRIDGE, Elizabeth M. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. **Trends in neurosciences**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 18–30, 2018. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223617302126>. Acesso em: 20 jan.

2018.

HRUSKA, R E *et al.* Effects of Estrogen on Striatal Dopamine receptor function in male and female rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 285–291, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7200238>. Acesso em: 28 maio 2018.

IMPROTA-BREARS, T *et al.* Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 8, p. 4686–4691, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200323>. Acesso em: 28 jan. 2018.

INAGAKI, T.; GAUTREAUX, C.; LUINE, V. Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 415–426, 2010.

IRWIN, Ronald W *et al.* Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 6, p. 3167–3175, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292191>. Acesso em: 6 jul. 2016.

JAKACKA, Monika *et al.* An Estrogen Receptor (ER) α Deoxyribonucleic Acid-Binding Domain Knock-In Mutation Provides Evidence for Nonclassical ER Pathway Signaling *in Vivo*. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2188–2201, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351685>. Acesso em: 28 jan. 2018.

KARA, N. Z.; EINAT, H. Rodent models for mania: Practical approaches. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 354, n. 1, p. 191–201, 2013.

KAUR, C; MANGAT, H K. Inferences derived from electroencephalographic responses to acute administration of clomiphen citrate in male albino rats. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 489–494, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6782597>. Acesso em: 4 jun. 2018.

KELLY, M J *et al.* Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. **Steroids**, [s. l.], v. 64, n. 1–2, p. 64–75, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323674>.

KELLY, Martin J.; RØNNEKLEIV, Oline K. Membrane-initiated Estrogen Signaling in Hypothalamic Neurons. **Molecular and cellular endocrinology**, [s. l.], v. 290, n. 1–

2, p. 14, 2008. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2601664/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16356651/). Acesso em: 14 ago. 2022.

KESSLER, Ronald C. *et al.* Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 29, n. 2–3, p. 85–96, 1993.

KHAN, Sabrina J. *et al.* Bipolar Disorder in Pregnancy and Postpartum: Principles of Management. **Current Psychiatry Reports**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781551>. Acesso em: 12 dez. 2016.

KNUTSON, B; BURGDORF, J; PANKSEPP, J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 65–73, 1998.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528115>. Acesso em: 29 jul. 2018.

KNUTSON, Brian; BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological Bulletin**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 961–977, 2002. Disponível em: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0033-2909.128.6.961><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405139>.

KOVATS, Susan. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular immunology**, [s. l.], v. 294, n. 2, p. 63–69, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000887491500026X>. Acesso em: 28 jan. 2018.

KOW, Lee Ming; BROWN, Harold E.; PFAFF, D. W. Activation of protein kinase C in the hypothalamic ventromedial nucleus or the midbrain central gray facilitates lordosis. **Brain Research**, [s. l.], v. 660, n. 2, p. 241–248, 1994.

KULKARNI, Jayashri *et al.* A pilot study of hormone modulation as a new treatment for mania in women with bipolar affective disorder. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 543–547, 2006. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16356651/>. Acesso em: 16 ago. 2022.

KUMAR, Channi *et al.* Estrogen administration does not reduce the rate of recurrence of affective psychosis after childbirth. **The Journal of clinical psychiatry**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 112–118, 2003. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12633118>. Acesso em: 28 jan. 2018.

KUROSAWA, Takako *et al.* Clomiphene citrate elicits estrogen agonistic/antagonistic

effects differentially via estrogen receptors α and β . **Endocrine Journal**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 517–521, 2010. Disponível em:

<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/endocrj/K09E-368?from=CrossRef>. Acesso em: 4 jun. 2018.

KUSHNER, P J *et al.* Estrogen receptor pathways to AP-1. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 311–317, 2000.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162939>. Acesso em: 28 jan. 2018.

LEWIS, Katie J.S. *et al.* Mania triggered by sleep loss and risk of postpartum psychosis in women with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 225, p. 624–629, 2018. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28889048>. Acesso em: 28 jan. 2018.

LIMA, Marcelo M S *et al.* Blockage of dopaminergic D2 receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 188, n. 2, p. 406–411, 2008. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18201777>. Acesso em: 12 set. 2017.

LUINE, V N. Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 484–490, 1985. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2990988>. Acesso em: 28 jan. 2018.

LUKAS, Michael; WÖHR, Markus. Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 56, p. 35–44, 2015.

MA, Sean T.; RESENDEZ, Shanna L.; ARAGONA, Brandon J. Sex differences in the influence of social context, salient social stimulation and amphetamine on ultrasonic vocalizations in prairie voles. **Integrative Zoology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 280–293, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952968>. Acesso em: 25 jan. 2018.

MALHI, Gin S. *et al.* Potential Mechanisms of Action of Lithium in Bipolar Disorder. **CNS Drugs**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 135–153, 2013. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23371914>. Acesso em: 28 jan. 2018.

MANJI, Hussein K *et al.* Lithium Decreases Membrane-Associated Protein Kinase C in Hippocampus : Selectivity for the α Isozyme. [s. l.], 1993.

MARSH, Wendy K.; GERSHENSON, Bernice; ROTHSCCHILD, Anthony J. Symptom

- severity of bipolar disorder during the menopausal transition. **International Journal of Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 17, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296381>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- MARSH, Wendy K.; KETTER, Terence A.; RASGON, Natalie L. Increased depressive symptoms in menopausal age women with bipolar disorder: Age and gender comparison. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 798–802, 2009.
- MARTINOWICH, Keri; SCHLOESSER, Robert J.; MANJI, Husseini K. Bipolar disorder: From genes to behavior pathways. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 119, n. 4, p. 726–736, 2009.
- MCEWEN, Bruce. Estrogen actions throughout the brain. **Recent progress in hormone research**, [s. l.], v. 57, p. 357–384, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12017552>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- MCEWEN, B S; ALVES, S E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocrine reviews**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 279–307, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368772>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- MCKENNA, Neil J.; LANZ, Rainer B.; O'MALLEY, Bert W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology ¹. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 321–344, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368774>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- MEINHARD, Ninja; KESSING, Lars Vedel; VINBERG, Maj. The role of estrogen in bipolar disorder, a review. **Nordic journal of psychiatry**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 81–87, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510130>.
- MERMELSTEIN, P G. Membrane-localised oestrogen receptor alpha and beta influence neuronal activity through activation of metabotropic glutamate receptors. **Journal of neuroendocrinology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 257–262, 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2009.01838.x>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- MORGAN, M A; PFAFF, D W. Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. **Behavioural brain research**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 85–93, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853861>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- MORISSETTE, M. *et al.* Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. **The Journal of Steroid Biochemistry and**

- Molecular Biology**, [s. l.], v. 108, n. 3–5, p. 327–338, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936613>. Acesso em: 1 mar. 2018.
- MUNK-OLSEN T *et al.* New parents and mental disorders: A population-based register study. **JAMA**, [s. l.], v. 296, n. 21, p. 2582–2589, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.296.21.2582>http://jama.jamanetwork.com/data/Journals/JAMA/5069/joc60161_2582_2589.pdf.
- NATUSCH, C; SCHWARTING, R K W. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 251–259, 2010. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305710001498>. Acesso em: 12 set. 2017.
- NICOLETTI, Ferdinando *et al.* Comparative Effects of Estradiol Benzoate, the Antiestrogen Clomiphene Citrate, and the Progestin Medroxyprogesterone Acetate on Kainic Acid-Induced Seizures in Male and Female Rats. **Epilepsia**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 252–257, 1985. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1157.1985.tb05414.x>. Acesso em: 4 jun. 2018.
- NUMAKAWA, Tadahiro *et al.* Protective Action of Neurotrophic Factors and Estrogen against Oxidative Stress-Mediated Neurodegeneration. **Journal of toxicology**, [s. l.], v. 2011, p. 405194, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21776259>. Acesso em: 6 jul. 2016.
- NUNES JÚNIOR, G P; TUFIK, S; NOBREGA, J N. Autoradiographic analysis of D1 and D2 dopaminergic receptors in rat brain after paradoxical sleep deprivation. **Brain research bulletin**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 453–456, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082038>. Acesso em: 12 set. 2017.
- ÖSTERLUND, Marie K.; HURD, Yasmin L. Acute 17 β -estradiol treatment down-regulates serotonin 5HT(1A) receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. **Molecular Brain Research**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 169–172, 1998.
- PALENICEK, T. *et al.* Increased sensitivity to the acute effects of MDMA (“ecstasy”) in female rats. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 546–553, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938405003537>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- PAYNE, J L. The role of estrogen in mood disorders in women. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 280–290, 2003.

PEREIRA, Marcela *et al.* Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania?. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 231, n. 13, p. 2567–2577, 2014.

PEREIRA, Marcela *et al.* Antimanic-like effect of tamoxifen is not reproduced by acute or chronic administration of medroxyprogesterone or clomiphene.

Neuroscience letters, [s. l.], v. 500, n. 2, p. 95–98, 2011. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394011009062>. Acesso em: 25 maio 2018.

PERICH, Tania; USSHER, Jane; MEADE, Tanya. Menopause and illness course in bipolar disorder: A systematic review. **Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 434–443, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796389>. Acesso em: 28 jan. 2018.

PHAN, Anna *et al.* Low Doses of 17 β -Estradiol Rapidly Improve Learning and Increase Hippocampal Dendritic Spines. **Neuropsychopharmacology** 2012 37:10, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 2299–2309, 2012. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/npp201282>. Acesso em: 13 ago. 2022.

RIPPBERGER, Henrike *et al.* Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine- Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 220–232, 2015. Disponível em:

<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cn/2015/00000013/00000002/art00008> %5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411764>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4598433>. Acesso em: 12 maio 2021.

SABIONI, Pamela *et al.* The antimanic-like effect of tamoxifen: Behavioural comparison with other PKC-inhibiting and antiestrogenic drugs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1927–1931, 2008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027858460800290X>. Acesso em: 4 jun. 2018.

SAFE, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. **Vitamins and hormones**, [s. l.], v. 62, p. 231–252, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11345900>. Acesso em: 28 jan. 2018.

SCARDOCHIO, Tina *et al.* The Effects of Electrical and Optical Stimulation of Midbrain Dopaminergic Neurons on Rat 50-kHz Ultrasonic Vocalizations. **Frontiers**

in **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. December, p. 1–15, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00331/abstract>. Acesso em: 29 jul. 2018.

SCHWARTING, R. K W; JEGAN, Nikita; WÖHR, Markus. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 182, n. 2, p. 208–222, 2007.

SELLIX, Michael T *et al.* Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. **Brain research**, [s. l.], v. 1005, n. 1–2, p. 164–181, 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899304001672>. Acesso em: 28 jan. 2018.

SMEJKALOVA, Tereza; WOOLLEY, Catherine S. Estradiol Acutely Potentiates Hippocampal Excitatory Synaptic Transmission through a Presynaptic Mechanism. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 30, n. 48, p. 16137–16148, 2010. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/30/48/16137>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SMITH, Carolyn L.; O'MALLEY, Bert W. Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 45–71, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769827>. Acesso em: 28 jan. 2018.

TALAEI, Ali *et al.* Tamoxifen: A Protein Kinase C Inhibitor to Treat Mania: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Placebo-Controlled Trials. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 272–275, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088436>. Acesso em: 26 fev. 2018.

TEATERO, Missy L; MAZMANIAN, Dwight; SHARMA, Verinder. Effects of the menstrual cycle on bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 22–36, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24467469>. Acesso em: 28 jan. 2018.

TER HORST, Gert J. *et al.* Sex differences in stress responses: Focus on ovarian hormones. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 239–249, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.036>.

THOMSON, Michael; SHARMA, Verinder. Between a rock-a-bye and a hard place: mood disorders during the peripartum period. **CNS Spectrums**, [s. l.], v. 22, n. S1, p.

49–64, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29350128>.

Acesso em: 28 jan. 2018.

TOMASIEWICZ, Hilarie C *et al.* Behavioral effects of short-term administration of lithium and valproic acid in rats. **Brain research**, [s. l.], v. 1093, n. 1, p. 83–94, 2006.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687130>. Acesso em: 29 jan. 2018.

TORAN-ALLERAND, C. D. Estrogen and the brain: Beyond ER- α and ER- β .

Experimental Gerontology, [s. l.], v. 39, n. 11-12 SPEC. ISS., p. 1579–1586, 2004.

TSAI, M; O'MALLEY, B W. Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 451–486, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979245>.

Acesso em: 28 jan. 2018.

VAN DER POEL, Augustinus M.; MICZEK, Klaus A. Long Ultrasonic Calls in Male Rats Following Mating, Defeat and Aversive Stimulation: Frequency Modulation and Bout Structure. **Behaviour**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 127–142, 1991. Disponível em:

<http://booksandjournals.brillonline.com/content/journals/10.1163/156853991x00409>.

Acesso em: 13 jul. 2016.

VEDDER, Lindsey C *et al.* Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. **Hippocampus**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 108–115, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.22068>.

Acesso em: 28 fev. 2018.

VIGUERA, Adele C *et al.* Episodes of mood disorders in 2,252 pregnancies and postpartum periods. **The American journal of psychiatry**, [s. l.], v. 168, n. 11, p. 1179–1185, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799064>.

Acesso em: 6 jul. 2016.

WANG, L. *et al.* Estrogen Actions in the Brain. **Science Signaling**, [s. l.], v. 2002, n. 138, p. pe29–pe29, 2002. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084905>. Acesso em: 28 jan. 2018.

WANG, H Y; FRIEDMAN, E. Enhanced protein kinase C activity and translocation in bipolar affective disorder brains. **Biological psychiatry**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 568–575, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8886289>. Acesso

em: 28 jan. 2018.

WANG, H Y; FRIEDMAN, E. Lithium inhibition of protein kinase C activation-induced serotonin release. **Psychopharmacology (Berl)**, [s. l.], v. 99, n. 0033-3158 (Print),

p. 213–218, 1989.

WEBB, P *et al.* Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 443–456, 1995. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7659088>. Acesso em: 28 jan. 2018.

WEHR, T A *et al.* 48-hour sleep-wake cycles in manic-depressive illness: naturalistic observations and sleep deprivation experiments. **Archives of general psychiatry**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 559–565, 1982. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6124223>. Acesso em: 18 jul. 2016.

WEIGEL, N L; ZHANG, Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, [s. l.], v. 76, n. 7, p. 469–479, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660165>.

Acesso em: 28 jan. 2018.

WENDLER, Etieli *et al.* Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1900–1908, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X16319745>. Acesso em: 13 mar. 2017.

WENDLER, Etieli *et al.* Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 88, p. 142–150, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29981775>. Acesso em: 9 ago. 2018.

WILLIAMS, Robin S. B. *et al.* A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. **Nature**, [s. l.], v. 417, n. 6886, p. 292–295, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015604>. Acesso em: 28 jan. 2018.

WÖHR, Markus; SCHWARTING, Rainer K.W. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and tissue research**, [s. l.], v. 354, n. 1, p. 81–97, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23576070/>. Acesso em: 22 dez. 2021.

WRIGHT, Jennifer M; DOBOSIEWICZ, May R S; CLARKE, Paul B S. The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 225, n. 4, p.

853–868, 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-012-2871-1>. Acesso em: 31 ago. 2017.

YOEST, Katie E; CUMMINGS, Jennifer A; BECKER, Jill B. Estradiol, dopamine and motivation. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 83–89, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25540977>. Acesso em: 9 jan. 2018.

YOEST, Katie E.; QUIGLEY, Jacqueline A.; BECKER, Jill B. Rapid effects of ovarian hormones in dorsal striatum and nucleus accumbens. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 104, p. 119–129, 2018. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC6197937>. Acesso em: 23 ago. 2022.

YOUNG, Jared W.; HENRY, Brook L.; GEYER, Mark A. Predictive animal models of mania: Hits, misses and future directions. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1263–1284, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410454>. Acesso em: 29 jan. 2018.

YOUNG, Robert C.; MOLINE, Margaret; KLEYMAN, Felix. Hormone Replacement Therapy and Late-Life Mania. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 179–181, 1997. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064748112611038>.

ZHANG, Fang *et al.* Inhibitory Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) in Response to Lithium. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 35, p. 33067–33077, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796505>. Acesso em: 28 jan. 2018.

ZHAO, Liqin; BRINTON, Roberta Diaz. Estrogen receptor α and β differentially regulate intracellular Ca^{2+} dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. **Brain Research**, [s. l.], v. 1172, n. 1, p. 48–59, 2007.

ANEXO 1



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



Nº 1175

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: 23075.025058/2018-25

APROVADO/APPROVAL: 22/05/2018 – R.O. 04/2018

TÍTULO: Avaliação da modulação do efeito do estradiol sobre modelos de mania em fêmeas.

TITLE: Evaluating the modulation of estradiol effect on mania models in female rats.

AUTORES/AUTHORS: Roberto Andreatini, Camila Pasquini de Souza, Letícia Trein Medeiros.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia


Profª. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA