



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

CAMILA NAYANE DE CARVALHO LIMA

**DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA,
FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E PADRÕES NEUROBIOLÓGICOS EM
RATOS ADULTOS COM ELEVADA E BAIXA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA
PRIVADOS DE SONO PARADOXAL NA ADOLESCÊNCIA.**

**NOVEMBRO
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

CAMILA NAYANE DE CARVALHO LIMA

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia.

Orientadora: Marta Maria de França
Fonteles

Co-orientadora: Danielle Macêdo
Gaspar

**DEZEMBRO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L1d LIMA, CAMILA NAYANE DE CARVALHO.
DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA, FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS
E PADRÕES NEUROBIOLÓGICOS EM RATOS ADULTOS COM ELEVADA E BAIXA ATIVIDADE
EXPLORATÓRIA PRIVADOS DE SONO PARADOXAL NA ADOLESCÊNCIA. / CAMILA NAYANE
DE CARVALHO LIMA. – 2016.
185 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

Coorientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

1. Temperamento. 2. Transtorno Afetivo Bipolar. 3. Genes do Relógio. I. Título.

CDD-615.1

CAMILA NAYANE DE CARVALHO LIMA

DETERMINAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA, FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E PADRÕES NEUROBIOLÓGICOS EM RATOS ADULTOS COM ELEVADA E BAIXA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA PRIVADOS DE SONO PARADOXAL NA ADOLESCÊNCIA.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Marta Maria de França Fonteles

Co-orientadora: Danielle Macêdo Gaspar

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. David Freitas de Lucena
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico esta dissertação ao meu exemplo de vida, a minha primeira Professora desde que nasci, e que sempre me estimulou a dar este grande passo. Esta pessoa com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por ser minha mãe, profissional correta e competente, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

Dedico a meu pai, cujo temperamento herdei, por ter me ensinado a atingir as minhas metas sempre com honestidade, trabalho duro, discrição e eficiência.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me dar força para continuar a caminhada, enfrentar e superar cada desafio. Obrigado por me fazer o que sou e por me permitir chegar onde estou.

Aos meus pais, pela minha existência! A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Por me proporcionarem as oportunidades que nunca tiveram. Minha eterna gratidão. Obrigada!

Ao meu amor, melhor amigo, companheiro, iniciação científica e marido Ueber, por estar sempre ao meu lado, dispensando seu amor, carinho compreensão, ajudando nos experimentos e sacrificando muitos finais de semana para me fazer companhia no laboratório, e, o melhor de tudo, sempre me cobrando para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. EU TE AMO MUITO!

Aos meus irmãos Alan Roges e Eduardo pela convivência amiga, pelo carinho, por sempre acreditarem que eu poderia conseguir tudo.

Aos meus sobrinhos: Pablo, Ana Giúlia, Letícia e Hillary por enfeitar e colorir minha vida!

À minha amiga Carol pela amizade de longa data, sólida e inabalável e aos meus amigos do grupo Várzea Intelectual: Eugênia, Rafael, Raviel e Clebim pelos momentos de cumplicidade e ajuda mútua.

Ao querido amigo Eliclécio, pela sua dedicação e grande ajuda durante os experimentos, imprescindível para a realização deste projeto. Agradeço ainda pelos sábados e domingos que dispôs para me ajudar quando foi necessário e pela paciência com o meu detalhismo.

À querida amiga Deisiane Viana pela tranquilidade, pela confiança, por sua ajuda inestimável e incondicional.

À minha querida amiga Michele, pela amizade e parceria, com muito bom humor sempre me colocando pra cima.

Às amigas Adriana e Isabelle por todos os momentos compartilhados, por tornarem os longos dias de experimentos mais agradáveis e prazerosos.

Às amigas Giovana e Taciana sempre presentes dando-me apoio e incentivo.

A amiga Edith por sua amizade, companheirismo e pelos momentos de conhecimento e alegrias mútuos.

Ao Adriano por sua imensa ajuda na realização dos experimentos comportamentais e pela sua disponibilidade em me ajudar.

À Professora Dra. Marta Maria de França Fonteles, pelo voto de confiança, pela oportunidade de participar de seu grupo, pelos ensinamentos científicos e amizade. Obrigado por ter acreditado em mim

À Profa. Dra. Daniele Macêdo pelas contribuições valiosas para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre reservar parte de seu tempo para compartilhar seus valiosos conhecimentos, ensinando-me desde a leitura de artigos a busca de ideias. Além de sua amizade e seus conselhos e pelo exemplo de pesquisadora, professora e mãe.

Ao Prof. David Lucena, Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior, à Profa. Dra. Silvânia, Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus, Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro e Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima por aceitarem a participar da minha banca de qualificação/defesa de doutorado e contribuírem para o aperfeiçoamento desta.

À professora Edna Guerra primeiramente pela acolhida, pela sua disponibilidade em me ajudar. É um privilégio te conhecer. Um grande exemplo de profissional, liderança, mulher e mãe.

Aos meus professores Raquel, Aline Albuquerque, Linicarla, Juliana Freitas, Germana, Herculano, João, Arisa, Nara Célia e Regina Dodt pela convivência, pelos momentos de descontração e pelos momentos de troca de conhecimentos não só científicos, mas para vida. Agradeço a Deus pela oportunidade de ter conhecido cada um.

A todos os professores da pós-graduação e técnicos de laboratório o meu muito obrigado. A todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia: Paulo Henrique, Débora, João Victor, Denia, Mariana Feitosa, Tatiane, Malu, Eduardo Ribeiro, Germana, Greicy, Ayane, Emiliano, Alana, Klistenes, Maria Isabel, Patrícia Xavier, Karen, Thaísa, Manuel ... mesma luta, sempre vencedores...

A todos os animais que já estiveram e que hoje estão presentes em minha vida, me ensinando a amá-los e respeitá-los cada dia mais e me incentivando a continuar trilhando os passos desta bela, mas nem sempre fácil profissão. Este trabalho é dedicado a eles, na esperança de que possa de alguma forma contribuir para sua qualidade de vida e bem estar.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

Por fim, a todos que são parte daquilo que sou hoje, obrigada!

RESUMO

Determinação de alterações na expressão gênica, fenótipos comportamentais e padrões neurobiológicos em ratos adultos com elevada e baixa atividade exploratória privados de sono paradoxal na adolescência.

O temperamento pode ser considerado como a base do humor, do comportamento e da personalidade, tem uma base biológica forte, manifesta-se cedo no desenvolvimento do indivíduo, norteia a formação dos hábitos sendo relativamente estável no decorrer do tempo. Evidências sugerem que o temperamento e os traços de personalidade predis põem aos transtornos de humor. Em função disso, é importante identificar fatores biológicos associados às distintas características do temperamento, como diferenças na expressão gênica e marcadores neuroquímicos para ajudar a dar mais evidências relacionadas à etiopatogenia de transtornos mentais como depressão e TAB. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo determinar alterações geno-fenótípicas em ratos adultos com elevada (HE) e baixa atividade exploratória (LE) expostos ou não à privação de sono paradoxal na adolescência. Na avaliação das bases neurobiológicas do temperamento foram selecionados ratos HE e LE de acordo com o seu perfil exploratório em um teste campo aberto, dessa forma foi utilizado um modelo de mania induzido por privação do sono de base temperamental. Foram avaliados testes comportamentais para atividade locomotora e exploratória, ansiedade, cognição, depressão, investigação de expressão gênica dos genes do relógio, estresse oxidativo e inflamação. Os resultados deste estudo mostraram que as diferenças comportamentais individuais, aqui chamadas padrões exploratórios podem ser caracterizadas em ratos. Fazendo uma translação para o ser humano estes padrões exploratórios refletem características temperamentais que influenciam uma variedade de comportamentos e parâmetros neuroquímicos e genéticos em resposta ao meio ambiente. Dessa forma, nossos resultados apontam para uma forte interação entre padrões exploratórios em animais (associados ao temperamento no ser humano) e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais tipo depressão ou mania na idade adulta, mostrando que a seleção de animais com base no seu padrão exploratório pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional em psiquiatria.

Palavras-chave: : Temperamento, Transtorno Afetivo Bipolar, Genes do Relógio

ABSTRACT

Determination of alterations in gene expression, behavioral phenotypes and neurobiological patterns in adult rats with high and low exploratory activity deprived of paradoxical sleep in adolescence

Temperament can be considered the basis of humor, behavior and personality, they have strong biological basis, early development of the individual. Evidences suggests that temperament and personality traits predispose to the mood disorders. Because of this, it is important to identify biological factors associated with various temperament characteristics, such as differences in gene expression and neurochemical markers to help further evidence related to the etiopathogenesis of mental disorders such as depression and BD. (HE) and low exploratory activity (LE) exposes or not paradoxical sleep deprivation in adolescence. In the evaluation of the neurobiological basis of temperament, HE and LE tests were selected according to their exploratory profile in an open field test, a model of mania induced by temperamental sleep deprivation was used. Behavioral tests for locomotor activity and exploratory analysis, anxiety, cognition, depression, gene expression investigation of the clock genes, oxidative stress and inflammation were evaluated. The results of this study show that as individual behavioral factors, the exploratory patterns can be characterized in rats. By doing a translation for the human being these exploratory patterns reflect temperamental characteristics that influence a variety of behaviors and neurochemical and genetic parameters in response to the environment. Thus, our results for a strong interaction between exploratory patterns in animals and stressful events in adolescence contributing to the development of behavioral control type depression or mania in adulthood, showing that a selection of animals based on their exploratory pattern may be an alternative Interesting for conducting research with models with translational validity in psychiatry.

Key words: Temperament, Bipolar Affective Disorder, Clock Genes

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Sistemas cerebrais que influenciam os padrões de estímulo e respostas	17
Quadro 2 - Primers utilizados forward e reverse para análise de q-PCR.	72
Quadro 3 - Resumo esquemático dos resultados obtidos na presente pesquisa.	121
Tabela 1- Valores mínimo, máximo, mediana, média, desvio padrão, percentil 25 e 75% da divisão temperamental dos animais.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eventos de desenvolvimento puberal e adolescência em roedores e humanos	29
Figura 2 - Sistema Circadiano.....	35
Figura 3 – Modulação do sistema circadiano e o sistema de resposta ao estresse no fenótipo psiquiátrico.....	37
Figura 4 - Interações entre o sistema circadiano e o eixo HPA.....	38
Figura 5 - Esquema ilustrativo do método de privação do sono paradoxal por múltiplas plataformas modificado.....	60
Figura 6 – Diagrama representativo do protocolo de privação do sono paradoxal.....	61
Figura 7 – Foto do aparato para realização do teste do campo aberto	63
Figura 8 - Desenho representativo do aparato para o teste plus maze.....	64
Figura 9 - Desenho representativo do aparato para o teste do nado forçado.....	65
Figura 10 - Desenho representativo do aparato para o teste Labirinto em Y	67
Figura 11 - Desenho representativo do aparato para teste NOR	69
Figura 12 – Atividade locomotora no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	82
Figura 13 – Atividade exploratória no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	83
Figura 14 – Tempo gasto de imobilidade no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	84
Figura 15 – Tempo gasto no centro do campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	85
Figura 16 – Razão do tempo de locomoção central/periferia no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	86
Figura 17 – Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto.....	87
Figura 18 – Percentagem de entrada nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	89
Figura 19 – Tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	90

Figura 20 – Índice de discriminação do objeto novo em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	92
Figura 21 – Percentagem de alterações corretas em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	93
Figura 22 – Tempo de imobilidade em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.	95
Figura 23 – Percentagem de preferência por sacarose em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	96
Figura 24 – Expressão gênica de Clock por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	98
Figura 25 – Expressão gênica de Bmal por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	99
Figura 26 – Expressão gênica de PER1 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	100
Figura 27 – Expressão gênica de PER2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	101
Figura 28 – Expressão gênica de PER3 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	102
Figura 29 – Expressão gênica de CRY1 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	103
Figura 30 – Expressão gênica de CRY2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	104
Figura 31 – Expressão gênica de TPH2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	105
Figura 32 – Expressão gênica por qPCR e protéica por imunoblotting hipocampal do receptor DRD2 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	107
Figura 33 – Níveis de GSH em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.	109
Figura 34 – Níveis de MDA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.	110
Figura 35 – Efeitos na expressão gênica de iNOS por qPCR e níveis de nitrito por ELISA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.	112
Figura 36 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-1 β em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	114

Figura 37 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-6 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	115
Figura 38 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-4 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	116
Figura 39 – Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.....	118
Figura 40 – Níveis de BDNF em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.	120
Figura 41 – Ilustração resumo	151
Figura 42 – Esquema da regulação da expressão de dos genes relógio estimulados pela dopamina	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
5-HT	Serotonina
ARTT	Alça de retroalimentação transcricional-translacional molecular
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Serina-treonina quinase
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BH4	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina sérica bovina
bcl-2	célula-B de linfoma 2 inibidora apoptose
Ca ²⁺	Cálcio
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CID-10	Código internacional de doenças
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CK1	Creatina quinase 1
CCGs	Genes controlados pelo relógio
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
DNase	Desoxirribonuclease
DA	Dopamina
D1	Receptor D1 da dopamina
DAT	Transportador de dopamina
D2	Receptor D2 da dopamina
DRD2	Receptor D2 da dopamina
DSM-IV	Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
Eaat1	Transportador de glutamato
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GR	Receptor de glicocorticóide
GRs	Elementos responsivos a glicocorticóides
GCs	Glicocorticoides
GSK3 β	Glicogênio sintetase kinase 3 β
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	Guanilato ciclase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células

GBR12909	gliais Bloqueador de transportador de dopamina
GABA	Ácido γ -amino-butírico
GSH	Glutationa reduzida
HE	Alto exploratório
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG	Eixo Hipófise-Pituitária-gonadal
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-1R α	Receptor de interleucina -1 α
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Enzima indoleamina 2,3-dioxigenase
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LE	Baixo exploratório
LDX	Dimesilato de Lisdexanfetamina
M	Molar
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
NSC	Núcleo supraquiasmático
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NEED	N-(1-naftil) etilenodiamina-dicloridrato
NF κ B	Fator de transcrição nuclear-Kb
NO ₂ -	Nitrito
NO	Óxido nítrico
NO _x	Metabólitos de óxido nítrico
NP-40	Nonidet p-40
NOR	Reconhecimento de objeto novo
PN	Pós nascimento
PS	Privação do sono
PSP	Privação do sono paradoxal
PBS	Tampão fosfato-salino

PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
REM	Movimentos extraoculares rápidos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TH	Tirosina-hidroxilase
TAB	Transtorno afetivo bipolar
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBST	Tampão salina Tris-hcl suplementado com Tween 20
Th1	T helper do tipo 1
Th2	T helper do tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TCI	Instrumento de entrevista inventário de temperamento e caráter
V	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Zn ²⁺	Zinco

Sumario

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	TEMPERAMENTO E PERSONALIDADE	13
1.2	BASES NEUROBIOLÓGICAS DO TEMPERAMENTO	16
1.3	AValiação DO TEMPERAMENTO EM ROEDORES.....	22
1.4	RELAÇÃO ENTRE TEMPERAMENTOS AFETIVOS E TRANSTORNOS DE HUMOR.....	23
1.5	EFEITO DE CONTINGÊNCIAS AMBIENTAIS NO CÉREBRO ADOLESCENTE: EVIDÊNCIAS DE ESTUDOS EM HUMANOS E ANIMAIS	27
1.6	CICLO CIRCADIANO E CICLO SONO-VIGÍLIA	33
1.6.1.	Interações entre o sistema circadiano e o eixo HPA.....	36
1.6.2.	Influência do eixo HPA (glicocorticóides) no sistema circadiano	39
1.6.3.	Interações do Ciclo Circadiano e o sistema dopaminérgico	40
1.6.4.	Disfunção do Ciclo Circadiano e do Ciclo Sono-Vigília nos Transtornos psiquiátricos	42
1.7	PROCESSOS OXIDATIVOS E NEUROINFLAMATÓRIOS NA NEUROBIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR	44
1.8	NEUROTROFINAS.....	47
1.9	MODELOS ANIMAIS COM BASE TEMPERAMENTAL E NA PRIVAÇÃO DO SONO	49
1.9.1.	Base temperamental.....	49
1.9.2.	Privação do Sono	51
1.10	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	54
2.	OBJETIVOS	56
2.1	OBJETIVO GERAL.....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3.	METODOLOGIA.....	57
3.1	ANIMAIS.....	57
3.1.1.	Separação comportamental em ratos alto exploratório (HE) e baixo exploratório (LE)..	57
3.2	MODELO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL	59
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL	60
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	62
3.4.1.	Parâmetros comportamentais testados em animais baixo e alto exploratórios.....	62
3.4.2.	Campo Aberto	62
3.4.3.	Labirinto em cruz elevado (<i>Plus Maze</i>).....	64
3.4.4.	Testes para avaliação do fenótipo depressivo.....	65
3.4.5.	Teste do nado forçado.....	65
3.4.6.	Teste da preferência pela sacarose.....	66
3.4.7.	Testes para Avaliação da Cognição	66
3.4.8.	Teste labirinto em Y (Y-maze)	67
3.4.9.	Teste de exploração do objeto novo (NOR).....	68
3.5.	Investigação dos endofenótipos genéticos.....	70
3.5.1.	Expressão Gênica por qPCR.....	70
3.5.2.	Preparação das amostras.....	70
3.5.3.	Extração do RNA	70
3.5.4.	Síntese do cDNA	71
3.5.5.	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	71
3.6	EXPRESSÃO PROTÉICA DO RECEPTOR DRD2	73
3.6.1.	Extração de proteínas.....	73
3.6.2.	Método Bradford para dosagem de proteína	73
3.6.3.	Western Blotting.	74
3.7	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	75

3.7.1.	Preparação de tecido	75
3.7.2.	Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)	75
3.7.3.	Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	75
3.7.4.	Determinação dos níveis de Nitrito	76
3.8	DOSAGEM DE BDNF HIPOCAMPAL E DE CITOCINAS (IL1B, IL-4, IL-6) NO HIPOCAMPO E PLASMA	76
3.8.1.	Preparo das amostras para a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA)	76
3.8.2.	Técnica de ELISA	77
3.8.3.	Determinação dos níveis de corticosterona plasmáticos	78
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
4.	RESULTADOS	79
4.1.	Testes Comportamentais	80
4.1.1.	80	
4.1.2.	Alterações comportamentais em ratos HE e LE submetidos ao modelo de privação sono paradoxal	80
4.1.3.	Comportamento de risco no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação sono paradoxal	88
4.2	TESTES COGNITIVOS	91
4.2.1.	Desempenho de animais HE e LE privados e não privados de sono nos testes de reconhecimento do objeto novo (NOR) e labirinto em Y (Ymaze)	91
4.3	TESTES DEPRESSÃO	94
4.3.1.	Avaliação de comportamentos tipo-depressão através dos testes de imobilidade (Nado forçado) e anedonia (preferência por sacarose) em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) privados ou não de sono paradoxal	94
4.4	EFEITOS DE GENOFENÓTIPOS EM RATOS ALTO EXPLORATÓRIOS (HE) E BAIXO EXPLORATÓRIOS (LE) SUBMETIDOS AO MODELO DE PRIVAÇÃO SONO PARADOXAL	97
4.5	AVALIAÇÃO DO RECEPTOR DE DOPAMINA D2 EM RATOS ALTO EXPLORATÓRIOS (HE) E BAIXO EXPLORATÓRIOS (LE) SUBMETIDOS AO MODELO DE PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL	106
4.6	DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	108
4.6.1.	Níveis de GSH e MDA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação sono paradoxal	108
4.7	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	111
4.8	EFEITOS EM RATOS ALTO EXPLORATÓRIOS (HE) E BAIXO EXPLORATÓRIOS (LE) SUBMETIDOS AO MODELO DE PRIVAÇÃO SONO PARADOXAL NOS NÍVEIS DE INTERLEUCINAS CEREBRAIS	113
4.9	EFEITOS NO EIXO HPA EM RATOS ALTO EXPLORATÓRIOS (HE) E BAIXO EXPLORATÓRIOS (LE) SUBMETIDOS AO MODELO DE PRIVAÇÃO SONO PARADOXAL	117
4.10	NÍVEIS DE NEUROTROFINA HIPOCAMPAL EM RATOS ALTO EXPLORATÓRIOS (HE) E BAIXO EXPLORATÓRIOS (LE) SUBMETIDOS AO MODELO DE PRIVAÇÃO SONO PARADOXAL	119
5.	DISCUSSÃO	121
6.	CONCLUSÃO	153
7.	REFERÊNCIAS	157

1. INTRODUÇÃO

1.1 Temperamento e Personalidade

Personalidade pode ser descrita como uma organização dinâmica, que a partir de um sistema psicobiológico individual regula a cognição, a emoção, o humor, o controle dos impulsos e as relações sociais, modulando, portanto, a adaptação ao ambiente (CLONINGER, SVRAKIC e PRZYBECK, 1993). A personalidade se caracteriza pela maneira como a pessoa pensa, sente, age, aprende a partir de suas experiências, percebe e se relaciona com o seu meio, bem como pensa sobre si, o outro e o mundo (CLONINGER, SVRAKIC e SVRAKIC, 1997). É o resultado da percepção interna de si mesmo, do meio ambiente e de suas experiências subjetivas (CLONINGER e SVRAKIC, 1999).

O temperamento, por sua vez, pode ser considerado como a base do humor, do comportamento e da personalidade, e popularmente se refere ao jeito de ser de cada indivíduo (LARA *et al.*, 2006). Está relacionado à natureza emocional, perceptual e cognitiva. Tem uma base biológica forte sendo relativamente estável no decorrer da vida, mas também sofre influências do meio e da cultura (ROTHBART *et al.*, 2000; ASENDORF, 2004; ROTH, 2013). Para Cloninger *et al.* (1993) as dimensões do temperamento são independentemente hereditárias, manifestam-se cedo no desenvolvimento do indivíduo e norteando a formação dos hábitos e funções cognitivas futuras, pois estão ligadas às sensações e motivações básicas e automáticas do indivíduo. Evidências sugerem que o temperamento e os traços de personalidade predis põem aos transtornos psiquiátricos (CLONINGER *et al.*, 1993; LARA e AKISKAL, 2006) em sua grande maioria sendo recorrentes e crônicos (INSEL, 2005).

O termo temperamento refere-se às tendências inatas que constituem a personalidade e pode ser definido como a tendência que o indivíduo tem para determinados padrões de reatividade emocional, de expressividade afetiva e níveis de sensibilidade diante de estímulos (MERIKANGAS *et al.*, 1998), ou, em uma definição mais simples, uma espécie de elemento constitucional e genético, que passa a ser elaborado para se constituir a personalidade que é aquilo que o sujeito é na realidade (ALLPORT, 1961).

Portanto, o conceito de personalidade se refere à interação de fatores inatos, representados pelo temperamento, com fatores ambientais, que, de forma dinâmica, moldam as características individuais. Esse padrão conceitual é similar ao modelo estresse-diátese, no qual uma predisposição genético-biológica (diátese) interage com eventos de vida (estresse) resultando em determinados comportamentos (MONROE & SIMONS, 1991).

O conceito de temperamento surgiu há cerca de 400 anos A.C. com Galeno e Hipócrates. Os temperamentos foram, então, classificados como colérico, melancólico, sanguíneo e fleumático, baseando-se nos quatro elementos do filósofo Empédocles: água, ar, terra e fogo (STRELAU, 1998; AKISKAL, 2005). No início do século XX, Kraepelin propôs os estados fundamentais: depressivo, ciclotímico, irritável e hipertímico, que correspondem ao que hoje chamamos de temperamentos afetivos (KRAEPELIN, 1921). Desde então, vários autores como Eysenck (1987), Cloninger (CLONINGER *et al.*,1993), Akiskal (AKISKAL *et al.*,1989) e outros apresentaram propostas de classificação e distinção dos 12 temperamentos, sendo que na psiquiatria os mais estudados são o modelo psicobiológico de Cloninger e o modelo de temperamentos afetivos de Akiskal.

Além de caracterizar os temperamentos afetivos como traços de manifestações psicopatológicas do humor, Akiskal utilizou princípios darwinianos para caracterizá-los também como componentes essenciais da natureza psicológica humana. Assim, sua teoria traz, por exemplo, que o tipo *hipertímico* caracteriza um estilo de vida mais exuberante, otimismo e confiança, o que em uma perspectiva evolucionária, favorece a liderança, a exploração da territorialidade e ao acasalamento. Em contraste, o temperamento *depressivo* estaria mais associado com uma hipersensibilidade ao sofrimento, atributo evolutivo a princípio vantajoso para cuidadores de crianças, jovens e pessoas doentes. O temperamento *ansioso* estaria associado a uma exagerada predisposição a preocupar-se com a sobrevivência do próprio fenótipo, o que seria o paradigma evolutivo da proteção do parentesco. Assim, os temperamentos depressivo e ansioso promoveriam comportamentos altruístas, porém estariam mais propensos ao sofrimento e à preocupação exagerada. O *ciclotímico* humor imprevisível e instável, que muda rapidamente ou de maneira desproporcional aos fatos; fases de grande energia,

entusiasmo e agilidade que se alternam com outras fases de lentidão, perda de interesse e desânimo. (AKISKAL, 1998, 2001; AKISKAL & AKISKAL, 2005).

A princípio, Cloninger (1987) esboçou três dimensões de personalidade independentes para identificar padrões de reações a estímulos específicos: busca de novidade (*novelty seeking*), a tendência para a excitação em resposta a estímulos novos ou recompensadores; fuga ao dano (*harm avoidance*), a tendência a responder intensamente aos sinais de estímulos adversos; e a dependência de recompensa (*Reward Dependence*), a tendência a responder intensamente aos sinais de recompensa e manter um comportamento anteriormente associado com ela. O modelo foi submetido a uma revisão se destacando uma quarta dimensão do temperamento: uma das subdimensões da Dependência de Recompensa, a persistência (*persistence*) (CLONINGER, SVRAKIC e PRZYBECK, 1993). Estes traços de personalidade são hipoteticamente relacionados aos sistemas neurotransmissores subjacentes, especialmente o dopaminérgico e o serotoninérgico. As duas principais dimensões de caráter são o autodirecionamento (*self-directedness*) e o cooperativismo (*cooperativeness*), os quais medem traços de maturidade respectivamente relativos à individualidade do sujeito e à sua adaptação social. Assim, eles são negativamente correlacionados com o risco para desenvolvimento de transtorno de personalidade por um paciente (PELLISSOLO E CORRUBLE, 2002).

A partir do consenso de que o temperamento tem componentes genéticos que estão subjacentes às alterações neurobiológicas, é suscitada a ideia de que familiares poderiam carregar consigo mais características em comum de temperamento. Outra ideia viável é a de que determinados polimorfismos genéticos poderiam estar associados às características individuais do temperamento. Tais ideias serão temas de discussão no próximo tópico dessa introdução.

1.2 Bases Neurobiológicas do temperamento

O temperamento começa a se formar em vida intrauterina a partir da 7ª semana da gravidez. É a partir do sistema vegetativo, pela base do sistema límbico, e que inclui o hipotálamo, a área pré-óptica e a hipófise, a amígdala central, a área septal, a substância cinzenta periaquedutal e os núcleos vegetativos do tronco encefálico. Esse conjunto de estruturas controla comportamentos necessários à sobrevivência de todos os mamíferos, cria e modulam funções como regulação da temperatura corporal, circulação do sangue, respiração, digestão, ciclo sono-vigília além de regular comportamento afetivo espontâneo, como agressividade, medo, raiva, comportamento de luta e fuga, sexualidade e controle alimentar (ROTH, 2013). Aparece na escala filogenética a partir dos mamíferos inferiores (mais antigos), e é compartilhado geneticamente ou por mudanças epigenéticas pela influência de experiências em vida intrauterina. Estas mudanças acontecem de maneira inconsciente e determinam o temperamento do indivíduo. Há, portanto, pouca ou nenhuma influência do aprendizado e da experiência (CLONINGER *et al.*, 1993).

Já para Roth (2013) o condicionamento emocional também influencia a constituição do temperamento, que é influenciável pela experiência, aprendizado e fortes emoções, em forma de eventos traumáticos ou se desenvolve de forma lenta e constante. (DAVIS, 2006; MAREN, 2008; QUIRK E MUELLER, 2008). A amígdala e os seus subnúcleos em conjunto com o núcleo accumbens, hipocampo, hipotálamo ventromedial, periaquedutal cinzenta e um número de núcleos de tronco cerebral, núcleos talâmicos, insulares, córtex e algumas regiões pré-frontais (principalmente córtex infralímbico) são o centro do condicionamento emocional, que acontece de forma totalmente inconsciente, sobretudo nos primeiros dois anos de vida, porque a memória declarativa se desenvolve mais tarde apenas aos três anos de idade. A amígdala também é local da percepção inconsciente de sinais relacionados a uma comunicação emocional pelo olhar, mímica, gestos, postura corporal. Portanto, a amígdala e os núcleos basais participam na interação entre experiências passadas e novos estímulos relacionados com novidade, medo, nojo, surpresa, alegria, desprezo, esperança, decepção e curiosidade, ocorrendo aprendizagem inconsciente de situações de perigo.

A teoria biossocial de personalidade de Cloninger envolve 4 dimensões do temperamento independentes: busca por novidade, prevenção de danos, recompensa e repêndência, e persistência. (CLONINGER, 1987, HEATH, 1994) Com base em dados neurofarmacológicos, neuroanatômicos e neuroquímicos essas dimensões estão relacionadas com atividade em sistemas de neurotransmissores monoaminérgicos baseados em estudos com radioligandos que investigaram neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica pré-sináptica e pós-sináptica e estudos de neuroimagem, em particular tomografia por emissão de positrões (PET), contribuíram para este ponto de vista (FARDE, 1997; MORESCO, 2002). No entanto, personalidade é um fenótipo muito complexo, e pouco se sabe sobre como os fatores ambientais ou sociais durante o desenvolvimento do cérebro e envelhecimento podem promover alterações regionais na neuroquímica.

Além disso, o sistema monoaminérgico não é exclusivo. Por exemplo, no estudo de Karolin (2009), a função da dopamina foi ligada ao desprendimento pessoal (retirada social), que é considerado o oposto da busca de novidade (Kaasinen, 2001; Yasuno, 2001), demonstrando que seria simplista atribuir apenas a um neurotransmissor.

Quadro 1 - Sistemas cerebrais que influenciam os padrões de estímulo e respostas

Traços de personalidade	Principal neuromodulador	Estímulo relevante – resposta comportamental
Busca de Novidades	Dopamina	Novidade: busca exploratória Recompensa potencial: busca por recompensa

		Alívio da monotonia ou do castigo: evitação ativa; fuga.
Evitação de Danos	GABA, serotonina (rafe dorsal)	Sinais condicionados para castigo, novidade ou frustração: evitação passiva, extinção.
Dependência de Recompensa	Norepinefrina, serotonina (rafe medial) Glutamato; serotonina (rafe dorsal).	Sinais condicionados para recompensa ou alívio do castigo: Resistência à extinção

Adaptado de CLONINGER (1987)

A Busca de Novidade verifica-se em escala filogenética a partir dos invertebrados. Está relacionada ao sistema de ativação comportamental, ao comportamento exploratório diante de novos estímulos, aproximação para estímulos de recompensa, evitação ativa de estímulos condicionados de punição e habilidade para esquiva de punição não condicionada. Pode estar envolvida com comportamentos impulsivos, rápida perda de controle e dificuldade em tolerar frustrações. Também estão envolvidos comportamentos como exploração entusiástica de estímulos novos e pouco familiares, com potencial para a originalidade, descobertas e recompensas. Projeções dopaminérgicas mesolímbicas e mesofrontais teriam um papel crucial para a ativação de cada aspecto do comportamento de exploração em animais e na ativação do comportamento prazeroso (CLONINGER, 1991)

Muitos estudos associaram a Busca de Novidade com a atividade dopaminérgica (HANSENNE *et al.*, 2002). O sistema motivacional dopaminérgico influencia as decisões se ações são gratificantes, se devem ser repetidas ou evitadas (ROTH e STÜBER, 2014). No estudo de Laere (2009) verificou-se que em seres humanos adultos normais que tinham maior disponibilidade de receptores canabinóides CB1R no cérebro correlaciona-se inversamente com comportamento de busca de novidade e mais

especificamente com sua subdimensão extravagância, apontando para outros sistemas envolvidos.

A Evitação ao Dano relaciona-se ao sistema de inibição comportamental e em escala filogenética verifica-se este comportamento em todos os animais. Caracteriza-se pela inibição frente a situações novas, ao risco de punição ou frustração (NATRIELLE FILHO, 2002). A psicobiologia do temperamento de esquiva é complexa. Em estudos animais, projeções serotoninérgicas ascendentes do núcleo dorsal da rafe até a substância negra inibem neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e são essenciais para a inibição condicionada da atividade após sinais de punição e frustração. Os benzodiazepínicos desinibem a evitação passiva condicionada pela inibição GABAérgica de neurônios serotoninérgicos originados no núcleo dorsal da rafe. As células serotoninérgicas anteriores do núcleo dorsal da rafe se misturam com células dopaminérgicas da área tegmental ventral e ambos os grupos inervam as mesmas estruturas (gânglios da base, núcleo accumbens e amígdala), promovendo influências dopaminérgicas e serotoninérgicas contrárias (opositoras) sobre a modulação dos comportamentos de aproximação e aversão. Sugere-se então que a dimensão Evitação de Danos estaria envolvida em um sistema complexo de neurotransmissores, incluindo a serotonina, a dopamina, o ácido gama amino-butírico (GABA) ou relacionada a receptores opióides (TUOMINEN, 2014). Estudos com Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) no National Institute of Mental Health (NIMH) com 18F-deoxiglicose (FDG), realizados em 31 adultos voluntários (saudáveis) durante a aplicação de tarefas simples, contínuas e de performance mostraram que a esquiva estava associada com aumento da atividade no circuito anterior paralímbico, especificamente na amígdala direita e ínsula, no córtex orbitofrontal direito e no córtex préfrontal medial esquerdo. Este padrão de ativação corresponde bem às projeções terminais serotoninérgicas da rafe dorsal. (Nelson et al, 1996)

A Dependência de Recompensa está relacionada ao sistema de manutenção do comportamento e à resposta a sinais de recompensa, característico dos mamíferos. Influencia a resposta de manter comportamentos previamente recompensados ou associados à gratificação ou alívio de punição. Manifesta-se por sentimentalidade, necessidade de contato social e dependência da aprovação alheia. Estaria relacionada ao sistema cerebral de manutenção de comportamento. (CLONINGER, 1991). As

projeções noradrenérgicas, provenientes do locus ceruleus, e serotoninérgicas, da rafe medial, estão relacionadas ao condicionamento por recompensa. O locus ceruleus e a rafe medial estão no mesmo nível posterior do tronco cerebral, e ambos os grupos de células monoaminérgicas inervam estruturas importantes na formação de associações pareadas, como o tálamo, o neocórtex e o hipocampo. Estudos neuropsicológicos mostram que o lobo temporal anterior decodifica "sinais sociais", como por exemplo imagens faciais e gestos sociais. Níveis elevados de dependência por recompensa estão associados com um aumento da atividade no tálamo, o que é consistente com as propostas sobre a importância das projeções serotoninérgicas para o tálamo, provenientes da rafe medial, na modulação da comunicação social. Também há uma associação de hipercortisolemia em pacientes com escores elevados deste traço de temperamento e melancolia (depressão), o que não se observa em indivíduos não deprimidos desta dimensão de temperamento (Triandis, Suh, 2002).

Além desses achados a literatura suporta a ideia de que características do temperamento são transmitidas nas famílias como traços de personalidade. Por isso, a semelhança de temperamento é bem maior em gêmeos homozigóticos, que compartilham 100% dos seus genes, do que em heterozigóticos, que compartilham em média 50% de seus genes. Em outras palavras, quanto mais genes são compartilhados pelos indivíduos, mais similares eles são com respeito ao traço ou comportamento que tem origem genética (STRELAU E ANGLEITNER, 1991).

Em um estudo utilizando-se a versão reduzida do TEMPS-A (*Temperament Evaluation of the Memphis, Pisa, Paris, and San Diego – Autoquestionnaire*) em pacientes com transtorno afetivo bipolar (TAB) clinicamente recuperados (23), familiares saudáveis de pacientes bipolares (52) e 102 controles em relação às variáveis do temperamento. Encontraram, por exemplo, que os familiares apresentaram menores escores para o temperamento ciclotímico que os pacientes, porém índices bem mais altos que os controles para esse subtipo. Os pacientes e seus familiares apresentaram escores bem maiores para o temperamento ansioso em relação aos controles. O temperamento hipertímico foi mais alto no grupo controle. Assim, propuseram que os familiares exibiram uma instabilidade ciclotímica do humor e uma inclinação à ansiedade não observada nos controles (MENDLOWICZ *et al.* 2005b)

Outro estudo avaliou o temperamento ciclotímico em 177 voluntários sem transtornos de humor, sendo 37 com história familiar positiva, 40 com um familiar de primeiro grau com TAB tipo 1, segundo os critérios do DSM-IV e 100 com história familiar negativa para esses transtornos. O temperamento ciclotímico foi mais prevalente no grupo com história familiar positiva em relação ao grupo com história familiar negativa, além de significativamente mais altas no grupo com TAB. Dessa forma, foi proposto que o temperamento ciclotímico pode ser considerado um tipo de fenótipo ligado ao TAB, dentro do conceito de espectro do humor, servindo como um elo entre a genética molecular e comportamental (PIERRE CHIARONI *et al.*, 2005).

Esses traços de personalidade podem ser vistos como marcadores de vulnerabilidade e trazerem a perspectiva conceitual de serem utilizados para identificar maior risco de transtorno de humor, bem como, evidencia a associação familiar entre as características de temperamento dos pacientes já acometidos por um transtorno de humor e seus familiares, ditos saudáveis. Além disso, aspectos genéticos, como os polimorfismos da COMT (Val158Met) e BDNF (Val66Met) podem estar associados ao temperamento afetivo, bem como, a sua transmissão familiar de características temperamentais (FERREIRA, 2013).

O polimorfismo Val158Met da COMT está associado a transtornos psiquiátricos e traços de personalidade, sua presença é um fator predominante que determina uma maior atividade da COMT no córtex pré-frontal, o que resulta em níveis significativamente inferiores de dopamina sináptica, além de um relativo prejuízo funcional dessa região cerebral e associações com apresentações psicopatológicas da Esquizofrenia e do TAB (GOGHARI & SPONHEIM, 2008; CHEN *et al.* 2004; STEIN *et al.*, 2005). Evidências também sugerem a associação entre polimorfismos do BDNF e o TAB (NEVES-PEREIRA *et al.* 2002; SKLAR *et al.*, 2002; HASHIMOTO *et al.*, 2004).

Postula-se que uma regulação aberrante da plasticidade neuronal mediada por fatores neurotróficos, como o BDNF, no hipocampo e outras estruturas límbicas, resulta em alterações mal adaptativas e disfuncionais nas redes neurais possivelmente relacionadas à fisiopatologia dos quadros depressivos e características do temperamento e da personalidade (SCHMIDT and DUMAN, 2007).

Portanto, para melhor compreensão das bases biológicas do temperamento, modelos animais são utilizados atualmente, haja vista que são ferramentas importantes para o estudo e compreensão dos transtornos psiquiátricos, principalmente na busca de novos e melhores tratamentos.

1.3 Avaliação do temperamento em roedores

Existe uma extensa gama de fatores genéticos e neurobiológicos homólogos entre roedores e humanos, responsáveis pela variedade de comportamentos bem conservados entre as espécies. Além disso, características anatômicas e fisiológicas entre roedores e humanos são semelhantes, permitindo uma extrapolação cuidadosa das emoções nos animais (LANDGRAF *et al.* 1999; LANDGRAF *et al.*, 2007).

Baseado nisso, a aplicação de procedimentos para analisar o comportamento de ratos e camundongos são críticos para traduzir os rápidos avanços na genômica de mamíferos em avanços relevantes para o diagnóstico e tratamento de doenças psiquiátricas. Humanos e roedores têm uma origem evolutiva próxima (MURPHY *et al.*, 2001), o que sugere que o temperamento é uma característica genética estável que controla as motivações básicas e automáticas, organizado de modo semelhante em mamíferos (CLONINGER, 1999).

Alguns estudos se valem da seleção de populações de roedores segundo características comportamentais para avaliar a participação de determinados genes. Por exemplo, Hovatta e colaboradores (2005) verificaram que linhagens de camundongos que se mostravam mais ou menos ansiosas em testes comportamentais como o campo aberto e a caixa de claro/escuro apresentavam aumento da expressão do gene que codificam para a enzima glioxilase. Essa enzima foi mais expressa em regiões cerebrais que modulam a ansiedade, correlacionando assim uma característica do temperamento a uma maior expressão gênica desta enzima específica. Além disso, a ansiedade foi revertida após a deleção desse gene, confirmando esses achados.

Em uma abordagem complementar, estudos pré-clínicos têm sugerido que a seleção baseada no comportamento exploratório de roedores seria uma ferramenta útil para o estudo das bases biológicas do temperamento e da personalidade (Steimer e Driscoll, 2005). O pressuposto básico dessa estratégia é que o padrão de

comportamento exploratório desses animais resulta da interação, sobretudo de traços de fuga ao dano (*harm avoidance*) e de busca de novidade (*novelty seeking*) (MALLO *et al.*, 2007).

Kazlauckas *et al.* (2005) avaliaram características comportamentais em camundongos para selecionar fenótipos distintos com extremos de temperamento. O teste utilizado foi o teste de campo aberto com objeto central. Os resultados do estudo mostram que as diferenças individuais em temperamento podem influenciar uma variedade de comportamentos nos camundongos.

O perfil comportamental de baixa e alta exploração pelos camundongos está associado ao temperamento depressivo e hipertímico, semelhante aos temperamentos dos pacientes com depressão unipolar e TAB, respectivamente, o que demonstra a importância da utilização de modelos animais nos estudos para transtornos de humor.

Muitos estudos baseiam-se na ideia de que diferenças individuais na resposta neural e hormonal a uma novidade contribuem para que se observem diferenças quanto ao comportamento explorador e susceptibilidades a psicopatologias (ZUCKERMAN, 1990). Piazza *et al.* (1990) classificaram ratos com alta e baixa resposta locomotora. Animais com alta locomoção são mais susceptíveis às ações de psicoestimulantes e apresentam diferentes perfis de resposta a drogas de abuso. Entretanto, Thiel e colaboradores (1999) observaram que ratos com alta locomoção exploravam mais objetos novos (respondiam mais a novidades), no entanto respondiam de maneira semelhante aos ratos de baixa atividade exploratória em relação aos psicoestimulantes. Landgraf e colaboradores (1999) utilizaram o teste de labirinto em cruz elevado para avaliar a alta e baixa ansiedade. Os pesquisadores observaram que animais com baixa ansiedade são mais ativos, expressam maior agressividade e exploram mais a área central do campo aberto.

1.4 Relação entre temperamentos afetivos e transtornos de humor

Conforme mencionado anteriormente, o conceito de “temperamento afetivo” foi criado por Akiskal e colaboradores que trabalharam com a valorização e expansão das ferramentas kraepelianas, mantendo o termo “temperamento”, e enfatizando-o como o

componente da reatividade emocional, ou seja, ligado ao humor (AKISKAL & MALLYA, 1987; AKISKAL, 1992).

Assim, o conceito de temperamento afetivo está embasado no forte componente afetivo dos traços temperamentais, que constituem a personalidade e que perpassam por características pessoais ditas normais até acentuadas manifestações psicopatológicas nos transtornos de humor (AKISKAL, 2002).

Considerando as emoções como uma reação do indivíduo aos estímulos internos ou externos e que envolvem componentes somáticos (reações neurais, motoras e hormonais), pode-se concluir que o humor é o estado basal constituído pelas emoções (estímulos internos e externos) sentidas pelo indivíduo. Se esse sentimento for para o pólo positivo (agradável), ocorrerá à elevação do humor ou hipertimia e, se for para o pólo negativo (desagradável), a diminuição do humor ou hipotimia. Esses estados do humor podem se manifestar afetivamente como euforia, tristeza, irritabilidade e ansiedade, a exemplo. Realmente, a base da alteração é o humor, sendo o afeto, a manifestação ou reação individual que acompanha esse estado de humor ou ideia basal (FERREIRA, 2013).

Assim, quando há alterações mais importantes e duradouras do humor, é possível a formação de síndromes psicopatológicas. As síndromes do humor variam em gravidade, gerando mais ou menos repercussões funcionais ao indivíduo acometido. Quando essa repercussão é algo disfuncional, denomina-se Transtorno de Humor, a exemplo, do Transtorno Depressivo Maior, do TAB e do Transtorno Distímico (DALGALARRONDO, 2008; A.P.A., 2000).

Dessa forma o humor está associado ao temperamento, principalmente ao seu “componente afetivo”. Uma pessoa que se caracteriza por estar constantemente com o humor levemente diminuído pode não estar com depressão, mas ter um temperamento depressivo, ou seja, uma gradação mais leve da hipotimia que caracteriza a forma de agir e de ser dessa pessoa, já a pessoa com o humor aumentado pode não está com bipolar, mas com hipertimia (FERREIRA, 2013). O estudo das variáveis do temperamento e do que pode estar associado a elas, na genética e no ambiente, possíveis de serem caracterizadas em um indivíduo permitem predizer uma possível psicopatologia (CASPI et al., 1995). Tais características do temperamento precocemente

presentes são as mais adequadas formas de avaliação de risco de problemas emocionais (MERIKANGAS et al., 1998). Essas são duas afirmações que fazem referência à proposta de associação entre o temperamento, componente básico da personalidade, e a vulnerabilidade aos transtornos do humor.

Historicamente, o temperamento tem sido considerado um fator de vulnerabilidade ou um marcador comportamental para o TAB (KRAEPELIN, 1976; ANGST, 2000). Nesse contexto, tem se proposto que traços específicos do temperamento podem causar vulnerabilidade a episódios afetivos e, portanto, ter alguma participação causal no desenvolvimento dos transtornos de humor. Tal idéia recebeu o nome de hipótese da vulnerabilidade (AKISKAL et al., 1983). Por outro lado, os transtornos afetivos por si também podem afetar a personalidade, baseando-se no raciocínio de que a experiência sustentada de um transtorno do humor levaria a alterações na personalidade, de forma semelhante a um efeito cicatriz, o que foi denominado de hipótese da cicatriz ou da complicação (CLARK et al., 1994). O efeito cicatriz, por sua vez, pode depender de múltiplas variáveis, como número de episódios, severidade dos sintomas e resposta ao tratamento (CHRISTENSEN E KESSING, 2006). Além disso, os transtornos de humor e traços específicos de personalidade podem compartilhar uma história familiar comum ou predisposição genética (BLAIRY et al., 2000; ROGERS et al., 2004; NERY et al., 2008).

Estudos avaliando a personalidade de pacientes portadores de TAB por meio de um instrumento denominado: inventário de temperamento e caráter (TCI) têm reforçado os conceitos anteriores. O TCI é um instrumento clínico bem estabelecido para a mensuração de traços específicos da personalidade que se baseia no modelo psicobiológico proposto por CLONINGER (CLONINGER et al., 1993). Esse modelo assume que a personalidade deriva da interação dinâmica de quatro traços do temperamento e três traços do caráter. Os primeiros designados como busca de novidade, esquivar ao dano, a dependência de recompensa e persistência (*Novelty Seeking, Harm Avoidance, Reward Dependence e Persistence*) representam as respostas emocionais básicas que são manifestadas desde os estágios precoces da vida e se mantêm em toda ela e são parcialmente herdáveis. Os segundos designados como autodirecionamento, cooperativismo e auto-transcendência (*self-directedness, cooperativeness and self-transcendence*) representam os conceitos sobre si mesmo e

sobre as relações interpessoais, os quais são regulados pelos processos cognitivos que se desenvolvem durante a vida (CLONINGER *et al.*, 1994; CLONINGER *et al.*, 2005).

Assim, quando comparados com indivíduos saudáveis, pacientes com TAB obtiveram altos escores em busca de novidade (OSHER *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2005); esquiva ao dano (OSHER *et al.*, 1996; ENGSTROM *et al.*, 2004a; EVANS *et al.*, 2005), dependência de recompensa (OSHER *et al.*, 1996) e baixos escores de persistência (OSHER *et al.*, 1996; OSHER *et al.*, 1999) e autodirecionamento (ENGSTROM *et al.*, 2004a; EVANS *et al.*, 2005). No TAB, altos escores de fuga ao dano também foram associados com idade de início da doença mais precoce e menor tentativas de suicídio (ENGSTROM *et al.*, 2003; ENGSTROM *et al.*, 2004b; NERY *et al.*, 2008).

Assim, pacientes com TAB também foram comparados com pacientes com depressão maior e controles saudáveis (YOUNG *et al.*, 1995). Nesse estudo, os pacientes portadores de TAB apresentaram alta busca de novidade quando comparados com aqueles com depressão maior, e ambos esses grupos tiveram maior fuga ao dano do que os controles saudáveis. Isso indica que provavelmente a combinação de uma alta resposta de busca de novidade e alta resposta de fuga ao dano seja característica do TAB. Interessantemente, indivíduos com alta busca de novidade são descritos como exploradores, curiosos, extravagantes, entusiásticos e desordenados (CLONINGER *et al.*, 1994), características que lembram aquelas típicas da mania e que foram descritas desde Kraepelin em sua concepção original do temperamento na psicose maníaco-depressiva (KRAEPELIN, 1976; NERY *et al.*, 2008).

Também foi constatado que no TAB geralmente ocorrem altos escores de auto-transcendência em comparação com indivíduos saudáveis (EVANS *et al.*, 2005). Esse traço do caráter pode oferecer vantagens adaptativas frente ao sofrimento e sensação de perda (CLONINGER *et al.*, 1994), e, portanto tem sido especulado que altos índices desse traço em pacientes com TAB representaria um processo adaptativo para lidar com a sua condição (NERY *et al.*, 2008).

Para mais, tendo em vista a associação entre altos índices de busca de novidade e fuga ao dano em pacientes com TAB, sobretudo na fase de mania, e baixos índices de busca de novidade em pacientes com depressão unipolar, também se propõe que a

estratégia de seleção de extremos temperamentais pode ser relevante para melhorar os modelos animais de TAB e depressão unipolar (KAZLAUCKAS *et al.*, 2005). Nesse contexto, o perfil de alta atividade exploratória (alta busca de novidade) é compatível com o estado hipertímico relacionado ao TAB, assim como o perfil de baixa atividade exploratória (baixa busca de novidade e alta fuga ao dano) relembra o temperamento depressivo, associado à depressão maior (Hirshfeld-Becker *et al.*, 2003; Maremman *et al.*, 2005).

1.5 Efeito de contingências ambientais no cérebro adolescente: evidências de estudos em humanos e animais

A puberdade é o período de transição entre infância não reprodutiva para fase adulta e reprodutivamente competente, incluindo o desenvolvimento de características sexuais secundárias, extensivamente categorizados como os estágios de Tanner, passando por mudanças fisiológicas, psicossociais e culturais. Já as características biológicas da adolescência são mais nebulosas e incluem a neuroplasticidade e desenvolvimento de áreas corticais e límbicas do cérebro. Como tal, puberdade e adolescência também são períodos de grande desenvolvimento de plasticidade (DAHL E GUNNAR, 2009; PATTON E VINER, 2007; MARSHALL E TANNER, 1969, 1970; TANNER, 1962).

A neuroplasticidade que ocorre na puberdade e adolescência também pode contribuir para a vulnerabilidade de desenvolvimento de doenças mentais (ANDERSEN, 2003). Um estudo americano avaliou mais de 9000 pessoas representativas da população dos EUA, indicando que distúrbios afetivos, tais como ansiedade, TAB e depressão surgem durante a adolescência, com a idade de pico de início para estas doenças, de 14 anos (KESSLER *et al.*, 2005; PAUS *et al.*, 2008).

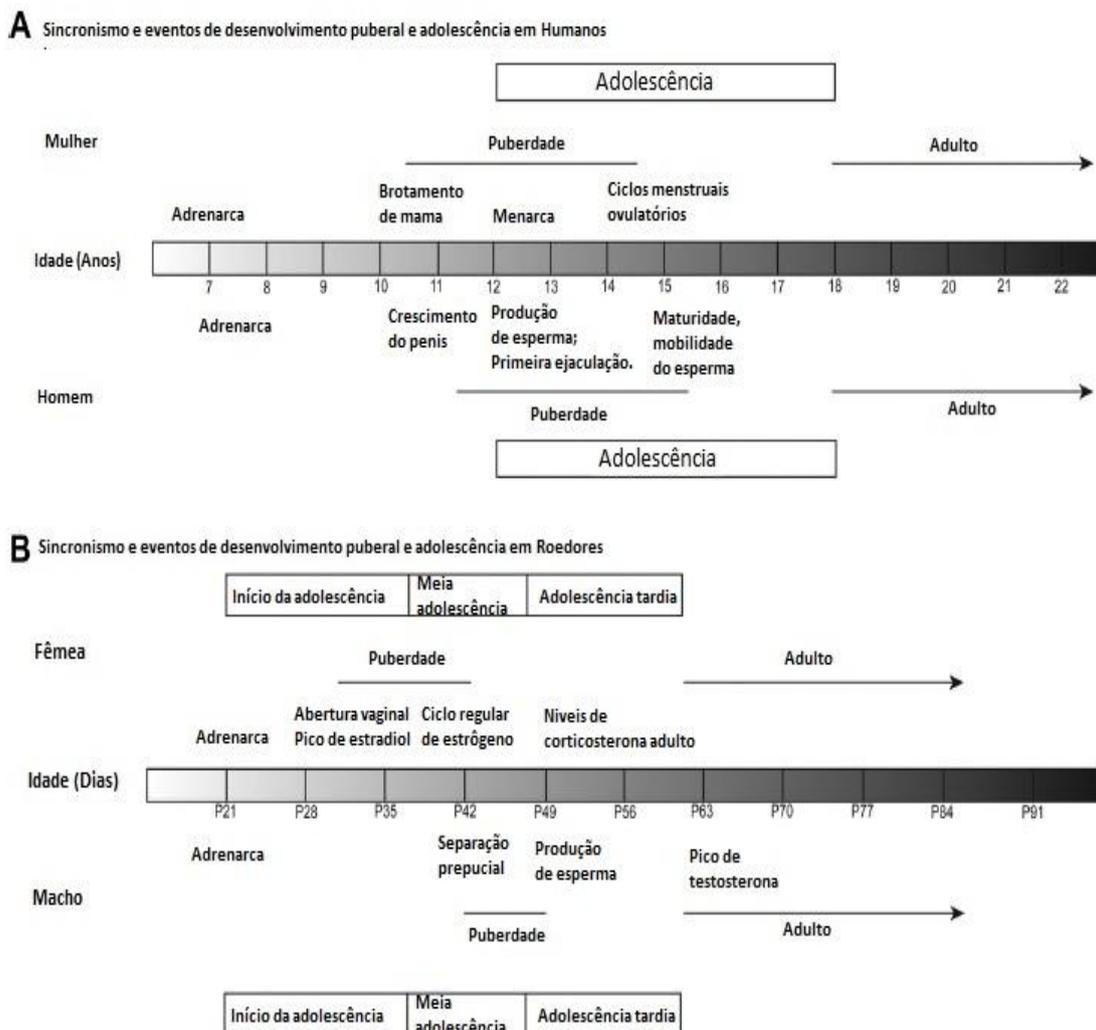
Os processos púberes são dependentes da presença dos hormônios sexuais estrogênio e progesterona em meninas, e testosterona em meninos (TANNER, 1962). Normalmente as meninas começam o desenvolvimento puberal em torno de 10-11 anos de idade e tem concluído o processo de 15-16 anos de idade (MARSHALL E TANNER, 1969; TANNER, 1962), enquanto que os meninos começam a puberdade um

pouco mais tarde em idades entre 11-12 e terminam antes dos 16-17 (MARSHALL E TANNER, 1969; TANNER, 1962).

Em roedores do sexo feminino, a primeira fase do desenvolvimento da puberdade é tipicamente o primeiro sinal externo de atividade do ovário (isto é, abertura vaginal). O dia da abertura vaginal é no dia 35 (P35) pós-natal em ratas (OJEDA e URBANSKI, 1994; OJEDA *et al.*, 1976) e P25 em camundongos fêmeas C57BL/6. Os marcadores externos do desenvolvimento puberal em roedores machos são a separação do prepúcio do pênis, glande, ou separação prepucial em média no P42. (KORENBROT *et al.*, 1977).

Além disso, estudos com roedores normalmente usam a idade cronológica, ao invés de estado pubertário para categorizar os animais, utilizando um sistema de classificação em adolescência precoce (P21-P34), média-adolescência (P35-46), e adolescência tardia (P47-59) (TIRELLI *et al.*, 2003). Outra convenção amplamente utilizada para as classificações da literatura define o período da adolescência de ratos como P28-42 (LANÇA, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Eventos de desenvolvimento puberal e adolescência em roedores e humanos



Tempo de eventos de desenvolvimento puberal e adolescência aproximada em seres humanos (A) e ratos (B). (A) A idade média do desenvolvimento da puberdade para meninas (superior) e meninos (parte inferior) (MARSHALL E TANNER, 1969, 1970; SIZONENKO, 1989; TANNER, 1962) e (B) sexo feminino (superior) e sexo masculino (inferior) (KORENBROT ET AL., 1977; LOHMILLER E SONYA, 2006; OJEDA E URBANSKI, 1994; OJEDA ET AL., 1976; PARKER E MAHESH, DE 1976; VANDENBERGH, 1967, 1969). Puberdade é definida pelo aparecimento de características sexuais secundárias, e o desenvolvimento da puberdade é definido pelo aparecimento da competência reprodutora, tal como indicado por ciclos menstruais ovulatórios e maduros, e espermatozoides móveis. Nos seres humanos, com idades variando de 12 a 18 são comumente usados como a faixa etária da adolescência (LANÇA, 2000); Considerando que, em ratos a adolescência é dividida em período: início, meio e tardia adolescência (TIRELLI *et al.*, 2003). Deve notar-se que os tempos indicados para fases particulares são bastante variável, e pode ser influenciada pelas condições ambientais e nutrição.

FONTE: ADAPTADO DE HOLDER EBLAUSTEIN, 2014.

Estudos demonstraram que a exposição a experiências estressantes de vida na peripuberdade ou adolescência são grandes contribuidoras para a vulnerabilidade de um indivíduo à doença mental (GE *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 2003, 2004.; SILVERMAN *et al.*, 1996; TURNER E LLOYD, 2004). No entanto, pouco se sabe sobre como o estresse pode perturbar o normal desenvolvimento neural durante o período puberal ou adolescente e produzir um cérebro que é particularmente vulnerável a doenças mentais.

Como mencionado anteriormente, os períodos de puberdade e adolescência são períodos de grande neuroplasticidade e desenvolvimento neural em seres humanos e em espécies roedores. Segue-se na puberdade processos de neurodesenvolvimento pós-natal que se iniciou no período pré-natal: (I) crescimento neuronal (PHOENIX *et al.*, 1959;.. PINOS *et al.*, 2001) ou morte (NUNEZ *et al.*, 2001); (II) crescimento das projeções axonais (BENES *et al.*, 2000;.. DAHL, 2004; LEWIS *et al.*, 2004); (III) reformulação da árvore dendrítica pela elaboração dendrítica ou de retração (GOLDSTEIN *et al.*, 1990; MEYER *et al.*, 1978); (IV) formação de sinapses (BOURGEOIS *et al.*, 1994; BOURGEOIS E RAKIC, 1993) ou eliminação (ANDERSEN *et al.*, 2002; GEROCIS *et al.*, 1986; HUTTENLOCHER E DABHOLKAR, 1997; MEYER *et al.*, 1978); e (V) mielinização (BENES *et al.*, 1994;.. NUNEZ *et al.*, 2000; WOO *et al.*, 1997).

Os roedores também experimentam no período da puberdade desenvolvimento neural e remodelação do cérebro. A remodelação cerebral púbere em roedores também inclui reorganização nos níveis pré e pós-sinápticos (SISK E ZEHR, 2005) e muitos são acionados pelos hormônios púberes (ANDERSEN *et al.*, 2002).

Existem múltiplos períodos sensíveis para a organização do cérebro e do sistema nervoso, que ocorrem principalmente durante os períodos de rápidas mudanças de desenvolvimento (SCOTT *et al.*, 1974). Um dos mais bem caracterizados é o período perinatal em roedores. Durante o período perinatal, os hormônios esteróides, testosterona e estradiol, têm a capacidade de organizar circuitos neurais e alterar permanentemente o cérebro e comportamentos. Isto é, mesmo uma breve exposição à testosterona ou estradiol pode sexualmente diferenciar o cérebro (LENZ *et al.*, 2012; MCCARTHY, 2010; PHOENIX *et al.*, 1959; WALLEN, 2005). Ademais, essas ações hormonais permanentes são limitadas às janelas críticas ou vulneráveis. Antes e após essas janelas de plasticidade, hormônios podem não afetar o desenvolvimento do cérebro (PHOENIX *et al.*, 1959). Por isso, que a puberdade agora é entendida como um

período de organização cerebral mediada por hormônios esteroides (SISK E ZEHR, 2005).

Nesse contexto, a experiência de vida de um indivíduo durante o desenvolvimento puberal e na adolescência pode ter consequências duradouras, que afetam profundamente a vida adulta. De fato, o estresse durante o desenvolvimento puberal e/ou juventude tem profundas alterações na fisiologia e comportamento, indicado por (I) aumenta de ansiedade e depressão (GE *et al.*, 2001; PATTON e VINER, 2007); (II) comportamentos de riscos e busca de novidades (ARNETT, 1996; ROBERTI, 2004; WAGNER, 2001); (III) alterações na aprendizagem e cognição (IMBOLTER *et al.*, 2013); e (IV) uso de drogas e abuso de álcool e (BEKMAN *et al.*, 2010; CRAWFORD *et al.*, 2003; MACPHERSON *et al.*, 2010).

Estresse precoce (incluindo infecção, trauma, negligência e abuso) é um fator de risco comum para uma variedade de doenças mentais, mesmo aquelas normalmente consideradas fortemente hereditárias e influenciadas geneticamente como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, TAB e esquizofrenia (CARR *et al.*, 2013; BRIETZKE *et al.*, 2012). Além disso, diferenças nas circunstâncias de vida, gênero, e outros estressores ambientais podem em última instância determinar quando uma desregulação temperamental passará a se manifestar como episódio depressivo maior, TAB, ou simplesmente se manter como um traço de personalidade (MENDLOWICZ *et al.*, 2005a).

O período da puberdade também é importante para a maturação do eixo de resposta ao estresse. Nesse contexto, a exposição a estressores durante a puberdade / adolescência altera a reatividade ao estresse, ou seja, aumenta a ansiedade e depressão, e diminui o desempenho cognitivo na idade adulta, sendo essas mudanças comportamentais correlacionadas com uma redução do volume hipocampal e alterações na plasticidade neural. Além disso, experiências estressantes durante a puberdade perturbam respostas comportamentais a hormonas sexuais, tanto no desempenho sexual, na cognição e emotividade. Estas alterações comportamentais se correlacionam com alterações na densidade de receptores de estrogênio em algumas áreas do cérebro, sugerindo uma remodelação do cérebro em resposta aos hormônios. Uma hipótese sugerida é que a ativação do sistema imune resulta em neuroinflamação crônica que pode mediar alterações comportamentais moduladas por hormônios na idade adulta.

(HOLDER, 2014) . Os glicocorticoides (GCs) são regulados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e desempenham um papel importante na resposta ao estresse. Em resposta a sinais do sistema límbico, o núcleo paraventricular hipotalâmico libera hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual sinaliza para a pituitária ou hipófise anterior para que ela por sua vez libere o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH hipofisário estimula a glândula adrenal a sintetizar e liberar para circulação sistêmica GCs, os quais alteram a expressão genética e fisiologia do corpo. Em indivíduos saudáveis, o aumento de GC em resposta ao estresse agudo leva ao aumento da vigilância, mobilização de glicose e ácidos graxos e aumenta a formação da memória (DE KLOET *et al.*, 200; LECOCQ *et al.*, 1964; PECKETT *et al.*, 2011). No entanto, a elevação dos GC após o estresse crônico, em longo prazo, produzirá efeitos prejudiciais com consequências imunossupressoras, metabólicas e neurotóxicas (MANIAM *et al.*, 2014; SAPOLSKY, 2000; COUTINHO E CHAPMAN, 2011). Por conseguinte, muitos transtornos neuropsiquiátricos estão associados a alterações no eixo HPA, com elevação crônica de cortisol e sensibilidade reduzida à GC (CARROLL, 1982), sugerindo que o estresse pode contribuir para o seu desenvolvimento.

A maturação do eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA) precede a maturação do eixo Hipófise-Pituitária-gonadal (HPG). Esta maturação resulta no aumento da secreção de hormônios pelas glândulas suprarrenais, aumento de cortisol em seres humanos cerca de 6-8 anos de idade (APTER *et al.*, 1979; WALKERET *et al.*, 200; PARKER, 1991); e corticosterona em ratos machos e fêmeas com pico por volta P45-60 (PIGNATELLI *et al.*, 2006; SPINEDI *et al.*, 1997).

Além disso, ratos no P28 (pré-puberes) e ratos adultos de ambos os gêneros respondem a um estressor agudo (por exemplo, estresse contenção) com níveis de ACTH e corticosterona similares. No entanto, ratos machos e fêmeas na pré-puberdade têm uma forma mais prolongada de resposta a corticosterona induzida pelo estresse em comparação com ratos adultos (ROMEIO *et al.*, 2004a, b)

Em ratos adultos a exposição repetitiva ao mesmo estressor resulta em uma habituação a resposta de corticosterona (GIROTTI *et al.*, 2006;. HARRIS *et al.*, 2004; HELMREICH *et al.*, 1997; Magarinos e McEwen, 1995; Marti e Armário, 1997), mas ratos machos que experimentam estresse repetidos no período pré-puberal não mostram essa mesma habituação de resposta à corticosterona. Na verdade, eles têm picos mais

elevados de ACTH, corticosterona, progesterona e adrenal, mas um retorno mais rápido para níveis basais (DOREMUS-FITZWATER *et al.*, 2009; ROMEO *et al.*, 2006).

Experiências em ratos expostos no início da vida ao estresse mostram elevação dos níveis GCs quando adultos (ZHANG *et al.*, 2013). Observações semelhantes foram feitas em humanos que mostram elevação crônica dos GCs e o tempo de resposta ao estresse alterada depois de evento traumático (MANIAM *et al.*, 20014). Os efeitos do estresse podem, portanto, ser persistentes e duradouros mesmo após a cessação do agente estressor.

O cérebro em desenvolvimento também é susceptível a interferências ambientais que podem resultar em danos em longo prazo (MEYER *et al.*, 2008). No entanto, Akiskal aponta que os temperamentos afetivos são processos intermediários entre a predisposição genética e fatores ambientais que afetam o desenvolvimento, ou seja, são elementos constitucionais e que podem ou não se manifestar nos episódios clínicos dos transtornos de humor (AKISKAL, 1995).

Portanto, é importante compreender os mecanismos neurais de como um estressor puberal pode produzir um cérebro que é suscetível a doenças mentais específicas. Usando modelos animais, pode-se investigar como o organismo puberal responde a um estressor, e como a experiência de estresse durante o desenvolvimento da puberdade altera a fisiologia e o comportamento de animais adultos.

Não restam dúvidas de que as interações entre temperamento, exposição ambiental, variação genética e gene-ambiente moldam a doença mental e os resultados do tratamento. Dessa forma, o estudo de possíveis diferenças de expressão gênica associadas à caracterização do temperamento deve ser encorajado. Nesse contexto, este trabalho dedicou-se ao estudo dos genes do relógio biológico associados com o ciclo circadiano e ciclo Sono-Vigília.

1.6 Ciclo Circadiano e Ciclo Sono-Vigília

O ciclo dia e noite da terra tem cerca de 24 horas e consiste em uma previsível mudança ambiental, fornecendo uma importante vantagem seletiva para aqueles seres capazes de antecipar e tirar benefícios dessa variação rítmica. Com isso, muitos aspectos

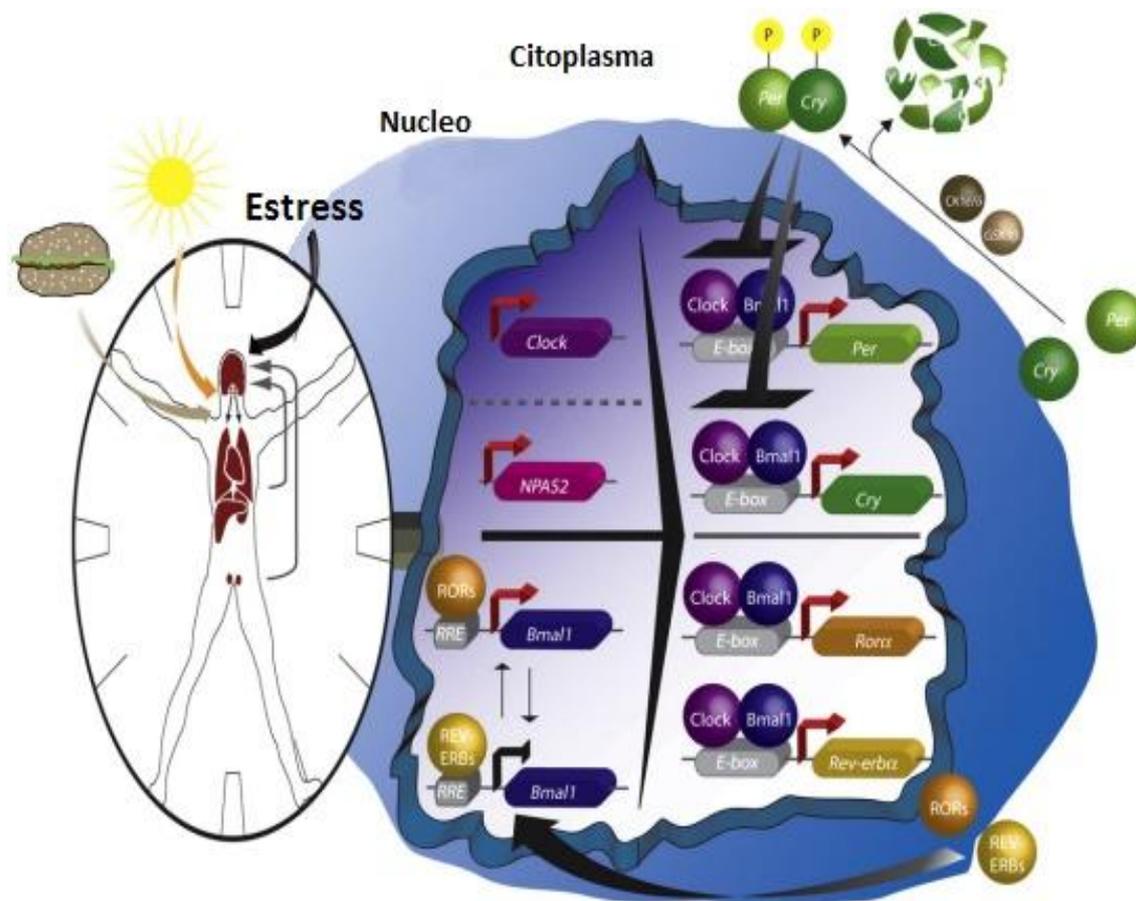
da fisiologia e do comportamento dos organismos apresentam variações rítmicas de 24 horas (JAGANNATH *et al.*, 2013).

Nos mamíferos, o mecanismo responsável por esse ritmo é uma alça de retroalimentação transcricional-translacional molecular (ARTT) composta pelos fatores de transcrição CLOCK e BMAL1, que acionam a expressão dos genes *clock*, *Period* e *Cryptochrome*. As proteínas de tais genes, respectivamente PER e CRY por sua vez, são fosforiladas por várias quinases no citoplasma e retornam para o núcleo, inibindo sua própria transcrição. Além disso, essa alça de retroalimentação também regula a expressão de vários outros genes em um padrão rítmico, resultando na oscilação coordenada de várias funções tecido-específica (REPPERT e WEAVER, 2002).

Ademais, este mecanismo oscilador molecular é encontrado em praticamente todas as células do corpo, formando uma rede de elementos sincronizados em aproximadamente 24 horas e ajustados às demandas ambientais (BALSALOBRE *et al.*, 2000). Essa sincronização é alcançada via um marcador circadiano principal, que, nos mamíferos, é localizado no núcleo supraquiasmático (NSC) no hipotálamo ventral. O relógio do NSC é ainda ajustado pelos estímulos do ciclo claro-escuro ambiental, detectados pelos fotorreceptores da retina e conduzidos pelo trato retino-hipotalâmico (FOSTER E HANKINS, 2002). Com isso, sinais neuronais e hormonais permitem a transmissão desse ritmo para as demais células do corpo, resultando em uma rede de sincronização temporal (ALBRECHT, 2012; JAGANNATH *et al.*, 2013).

O ciclo sono/vigília talvez seja o mais familiar ciclo circadiano, entretanto, em adição ao relógio circadiano, o sono também é regulado por mecanismos homeostáticos. Tais mecanismos podem ser verificados, quando na ausência ou encurtamento do sono, a propensão a ele é aumentada, enquanto, no excesso de sono, sua propensão é reduzida. Entretanto, os mecanismos precisos envolvidos nessa regulação ainda permanecem incertos (BORBELY E ACHERMANN, 1999). Embora se saiba que possa sofrer influência de fatores, como níveis de exposição à luz, questões sociais, hormônios do estresse e melatonina (JAGANNATH *et al.*, 2013).

Figura 2 - Sistema Circadiano



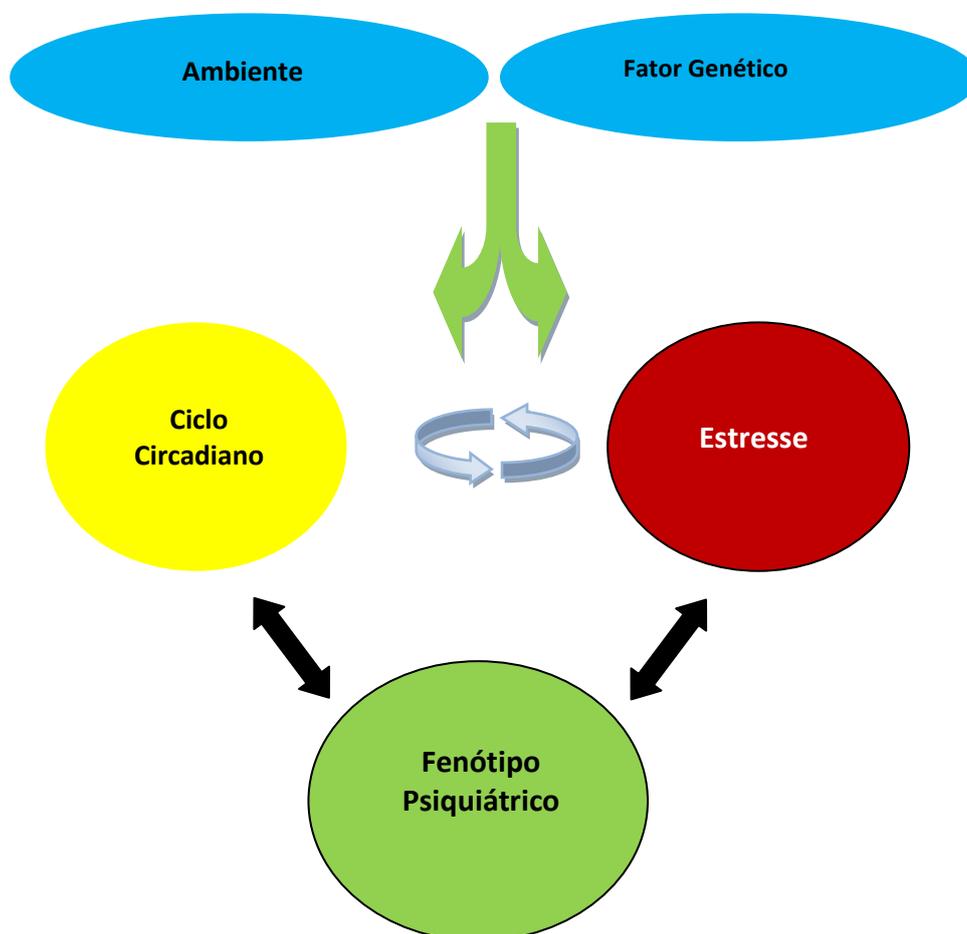
O sistema circadiano é controlado por muitos fatores. O Núcleo supraquiasmático é o relógio mestre no cérebro. É sensível à luz e orchestra a temporização dos ritmos em outras regiões do cérebro e por todo o corpo. Por sua vez, vários hormônios e peptídeos produzidos na periferia podem influenciar ritmos no cérebro e corpo. Outras influências ambientais, como alimentos e estresse também impactam nos ritmos no cérebro e corpo. O relógio celular é uma alça de feedback de translação de transcrição. O dímero CLOCK/BMAL1 regula a expressão de genes *Per* e *Cry*. As proteínas PER e CRY são modificadas por várias quinases incluindo CK1 e GSK3 β , além de retornarem para o núcleo e inibirem sua própria transcrição por retroalimentação negativa. Funções de NPAS2 são semelhantes à de CLOCK em certas regiões do cérebro. Já RevErba inibe enquanto Rora aumenta a transcrição de Bmal1 como parte de um circuito secundário.

FONTE: McClung, 2011

1. Interações entre o sistema circadiano e o eixo HPA

Distúrbios dos ciclos circadianos e respostas ao estresse alteradas estão envolvidos em muitos transtornos psiquiátricos, e é possível que fatores de risco genéticos e ambientais de um indivíduo para uma doença em particular estejam sujeitos à modulação combinada dos sistemas circadianos e resposta ao estresse. Dessa maneira, fatores de doenças específicos, por exemplo, predisposição única para o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia ou transtorno do uso de álcool é processada por um sistema de respostas generalizadas (duplas ações dos sistemas circadianos e resposta ao estresse) para determinar características específicas do fenótipo expresso conforme figura abaixo. (NADER, CHROUSOS, KINO, 2010).

Figura 3 – Modulação do sistema circadiano e o sistema de resposta ao estresse no fenótipo psiquiátrico



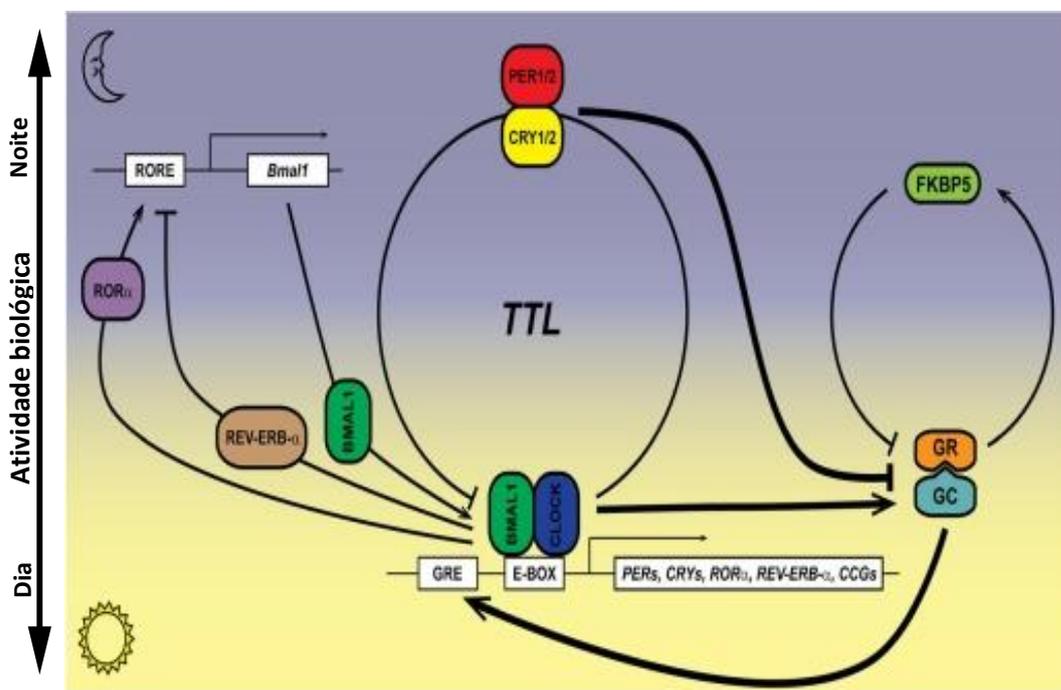
Os fatores ambientais e genéticos são modulados simultaneamente por duplas ações do relógio circadiano e do sistema de resposta ao estresse, que interagem para regular o funcionamento do cérebro. Por outro lado, o fenótipo psiquiátrico tem impactos no relógio circadiano e a resposta ao estresse.

FONTE: MODIFICADO DE LANDGRAF, 2014.

Em apoio a esta hipótese, o relógio circadiano e o sistema de resposta ao estresse estão intimamente conectados (Fig. 2). Muitos promotores de genes do relógio contêm elementos responsivos a glicocorticóides (GREs), e os glicocorticóides (GCs) sincronizam osciladores circadianos centrais e periféricos (NADER, CHROUSOS, KINO, 2010).

Por exemplo, os GC ativam a transcrição de genes PER que é importante para adaptação dos ritmos sono / vigília às mudanças de ambiente como trabalho por turno, *Jet lag* ou refeições irregulares (Kiessling et al., 2010; Le Minh et al., 2001). Sob condições fisiológicas, a liberação de GC segue um ritmo circadiano, em que os níveis de GC são maiores no início da fase ativa e menor no início da fase inativa. Na suprarrenal, a disponibilidade dos precursores esteroidais do colesterol, o armazenamento e a atividade de enzimas esteroidogênicas obedece a ritmos circadianos (OSTER *et al.*, 2006).

Figura 4 - Interações entre o sistema circadiano e o eixo HPA



O relógio circadiano e sistema de resposta ao estresse interagem entre si. Durante o dia as proteínas CLOCK e BMAL1 são expressas em níveis elevados para ativar a transcrição de PERs, Crys, ROR α , REV-ERB α , e CCGs, bem como para promover a atividade de GR que, por sua vez, elevar a transcrição de genes GC-induzível, como FKBP5. Uma alça de feedback auxiliar consiste em ROR α , um ativador de expressão BMAL1 e REV-ERB α , um inibidor de expressão BMAL1. GCs facilitam a expressão de genes do relógio GC-responsivos e genes controlados pelo relógio (CCGs) com os elementos promotores GRE. À noite, os níveis de proteínas PER e CRY são elevados e reprime a atividade de CLOCK/BMAL1 e a atividade de GR. Através da inibição por feedback, FKBP5 suprime a atividade GR. Devido à estreita ligação entre o sistema circadiano e o sistema de resposta ao estresse, manipulações de um sistema, naturalmente leva a mudanças no outro.

FONTE: MODIFICADO DE LANDGRAF, 2014.

O complexo CLOCK /BMAL1 interage com o receptor de glicocorticóide (GR), modulando a sensibilidade do GR ao ritmo circadiano, por meio da acetilação do GR pelo RELÓGIO durante o dia. Por conseguinte, camundongos *Bmal1*^{-/-} sofrem de baixos níveis e sensibilidade reduzida a corticosterona, que é uma resposta ao estresse perturbada (CHARMANDARI, 2011; LELIAVSKI *et al.*, 2014).

2. Influência do eixo HPA (glicocorticóides) no sistema circadiano

Muitas funções cerebrais relevantes para doenças psiquiátricas são controladas simultaneamente pelo sistema circadiano e de resposta ao estresse. Por exemplo, CLOCK/BMAL1 regula a expressão de tirosina-hidroxilase (TH), a enzima limitante na síntese de monoaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina). A expressão TH também é controlada pelos GRs, e o estresse crônico repetido está associado ao aumento da expressão TH. Em outras partes do sistema dopaminérgico, a sensibilidade aos receptores de dopamina é regulada pelo relógio circadiano, quando há aumento do CRF ou manipulações do GR afetam a sensibilidade de vias de recompensa dopamina-dependente (BOYSON *et al.*, 2014; PARNAUDEAU *et al.*, 2014).

O equilíbrio entre sinalização excitatória (glutamato) e inibitória (Ácido γ -amino-butírico, o GABA) também é influenciada simultaneamente pelos sistemas circadiano e estresse. Ratos *Per2Brdm1*^{-/-} mostram diminuição dos níveis do transportador de glutamato (Eaat1), o que leva a níveis extracelulares de glutamato elevados, enquanto que a pregnenolona, um precursor de GC que é estimulada por ACTH, atua como um antagonista do receptor de NMDA, e tem atividade antidepressiva em animais (SPANAGEL *et al.*, 2005).

Os níveis de GABA oscilam em áreas cerebrais de regulação do humor, como o nucleus accumbens e também estão envolvidos na estabilização do ritmo circadiano no SNC, onde atua como um neurotransmissor inibitório durante a noite e como um neurotransmissor excitatório durante o dia. Além disso, a liberação de GABA é facilitada pela GCs (CASTANEDA *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2000; DI *et al.*, 2009).

Assim, os sistemas relógio circadiano e de resposta ao estresse se sobrepõem amplamente, e regulam vários outros sistemas que podem afetar o processamento de recompensa, locomoção, e cognição. Estes sistemas sobrepostos podem trabalhar de forma coordenada para regular os mecanismos cerebrais moleculares que falham na doença psiquiátrica (LANDGRAF, MCCARTHY, WELSH, 2014).

3. Interações do Ciclo Circadiano e o sistema dopaminérgico

Os genes "Relógio" são uma família de fatores de transcrição que podem regular a expressão de genes através de sítios de ligação específicos chamados "E-box" localizados em suas regiões promotoras (DARLINGTON, 1998). A expressão dos genes do relógio não é limitada ao núcleo supraquiasmático (SCN), onde participam da alça de *feedback* molecular para operar o " relógio circadiano"; eles são fortemente expressos em várias partes do cérebro, incluindo o sistema mesolímbico (SHIEH, 2003; UZ *et al.*, 2005; MCCLUNG *et al.*, 2005; SHIEH *et al.*, 2005).

A nossa compreensão sobre como os genes do relógio estão envolvidos no funcionamento do SNC e patologias em vertebrados mudaram após a disponibilidade de camundongos transgênicos deficientes de vários membros da família do relógio (e.g. mClock, mPER1, mNPAS2). Tem sido demonstrado que a família de genes do relógio é crucial para o desenvolvimento de respostas comportamentais às drogas de abuso, isto é por modulação dopaminérgica no funcionamento do sistema mesolímbico (ABARCA *et al.*, 2002;. MCCLUNG *at al.*, 2003, 2005;. PERREAU-LENZ E SPANAGEL, 2008).

Genes do relógio não estão apenas envolvidos na ação de drogas de abuso, eles também são influenciados por essas drogas. Drogas psicoestimulantes (cocaína e anfetaminas) induzem mudanças nos níveis extracelulares de DA, a qual é responsável pela estimulação de seus receptores, os quais através de mecanismos de sinalização intracelular promovem ativação de fatores de transcrição e genes no sistema mesolímbico (HYMAN E MALENKA, 2001). Na verdade, as alterações transcricionais de expressão gênica do "relógio" no sistema mesolímbico (isto é, o corpo estriado) foram relatados após ambos os tratamentos com cocaína e metanfetamina (NIKAIDO *et al.*, 2001;. IJIMA *et al.*, 2002; YUFEROV *et al.*, 2003; UZ *et al.*, 2005; LYNCH *et al.*,

2008). Além disso, através de estudos com antagonistas desses receptores, tem sido sugerido que os sistemas de receptores, incluindo os receptores DA (i.e. D1), medeiam alterações na expressão de genes do relógio induzidas pela metanfetamina nesta região do cérebro (NIKAIDO *et al.*, 2001).

Mais recentemente, o aumento da expressão e fosforilação da tirosina hidroxilase, enzima etapa limitante na síntese de DA, foi reportada na área tegmental ventral de mutantes de genes CLOCK em resposta aos mecanismos de recompensa induzidos por cocaína (MCCLUNG *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que, quando se considera o potencial da dopamina em afetar o SNC, é importante considerar também que o aumento dos níveis desse neurotransmissor está associado ao aumento do estresse oxidativo, isso devido as propriedade redox inerente a ele (REES *et al.*, 2007). Mecanicamente, a DA pode ser metabolizada via monoamina oxidase, resultando na produção de H₂O₂ e ácido dihidroxifenilacético (Berman and Hasting, 1999) ou pode sofrer hidroxilação não enzimática, na presença do Fe⁺² e H₂O₂, culminando com a formação de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (GRAHAM *et al.*, 1978). Ambas as vias tem potencial para causar dano celular se o *status* oxidativo está desequilibrado. 6-OHDA pode promover a inibição do complexo mitocondrial I e o estresse do retículo endoplasmático (BERMAN e HASTINGS, 1999; REES *et al.*, 2007). Ademais, 6-OHDA pode ser convertida em a p-quinolona a qual, por sua vez, pode ativar a caspase 8, levando à apoptose (STOKES *et al.*, 1999; BERK *et al.*; 2011). Nesse contexto, BMAL1 em um complexo com CLOCK ou NPAS2 regula a homeostase redox cerebral e conecta o comprometimento da função do gene CLOCK à neurodegeneração (MUSIEK *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de comportamentos de dependência em resposta a psicoestimulantes administrados sistemicamente é complexo e exige o envolvimento de várias regiões do cérebro, tais como a área tegmental ventral, núcleo accumbens, e córtex pré-frontal, vários tipos de células, e um número de sistemas de neurotransmissores, incluindo dopaminérgicos e sistemas glutamatérgicos.

4. Disfunção do Ciclo Circadiano e do Ciclo Sono-Vigília nos Transtornos psiquiátricos

Distúrbios nos ritmos circadianos têm sido associados com funções cerebrais interrompidas, e as evidências dão suporte à ideia de que o relógio circadiano alterado é vulnerável a uma variedade de doenças mentais, incluindo o transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, TAB, transtorno depressivo maior, transtorno de abuso de substâncias e esquizofrenia (EZ) (WULFF, 2010).

Em observações clínicas, muitos pacientes psiquiátricos sofrem alterações de ciclos sono/vigília e apresentam distúrbios de ritmos nas funções diárias, como apetite e cognição. Por outro lado, ritmos disfuncionais em indivíduos saudáveis expostos a jornadas de trabalho invertidas e *jet lag* podem levar à deterioração da saúde mental, ressaltando as relações bidirecionais entre o relógio circadiano e comportamento, humor e cognição (ROSENBERG, DOGHRAJJI, 2011; KATZ *et al.*, 2001).

Em modelos animais, mutações dos genes do relógio ou manipulações do ciclo claro/escuro levam a alterações afetivas, fenótipos locomotores e comportamentais, demonstrando conexão direta entre genes do relógio e funções cerebrais relevantes para a doença psiquiátrica (LANDGRAF, 2014).

Portanto, a disfunção circadiana pode afetar profundamente o ciclo de sono, o que, por sua vez, tem sido associado a uma grande variedade de desordens emocionais, cognitivas e somáticas. Nesse ínterim, a disfunção do sono e do ciclo circadiano é uma característica comum dos transtornos neuropsiquiátricos, e essa observação não é nova. Desde Kraepelin em 1883, padrões anormais de sono têm sido associados a prejuízos na saúde mental. Além disso, mais de 80% dos pacientes com depressão e outras doenças mentais severas, como esquizofrenia, demonstram alguma anormalidade no sono. Apesar disso, a etiologia da disfunção do sono e do ciclo circadiano ainda é pouco compreendida e seu tratamento, comumente, negligenciado (MANOACH E STICKGOLD, 2009; JAGANNATH *et al.*, 2013).

Muitas linhas de evidência têm destacado a importância dos distúrbios do sono no TAB. Primeiro, a disfunção no sono é um dos principais sintomas desse transtorno e é exibido, embora com variações, entre os diferentes estados do humor no TAB. Durante os episódios de mania, por exemplo, geralmente, há uma redução da necessidade de sono, enquanto, nos episódios de depressão, pode ocorrer tanto insônia como hipersônia (HARVEY *et al.*, 2005; GRUBER *et al.*, 2009).

Outro achado importante é que os distúrbios do sono geralmente persistem, apesar do tratamento, em mais de 70% dos pacientes bipolares em estado de eutímia (HARVEY *et al.*, 2005). Nesse sentido, comparados com indivíduos saudáveis, esses pacientes bipolares eutímicos, geralmente, exibem um padrão anormal de longa duração e grande variabilidade do sono (MILLAR *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o sono é o pródromo mais comum dos episódios de mania e também não raramente antecede nos episódios de depressão (JACKSON *et al.*, 2003; GRUBER *et al.*, 2009). Essas alterações no padrão do sono podem precipitar episódios de humor. Em um estudo de acompanhamento de indivíduos com TAB recorrentemente maníacos, observou-se que a redução em seu tempo total de sono foi seguida por uma mudança no humor no sentido da geração ou agravamento da mania/hipomania, enquanto que o aumento no tempo total de sono foi seguido por uma tendência ao estado de depressão (BAUER *et al.*, 2006). Além disso, a indução experimental de privação do sono tem sido associada com a redução de sintomas depressivos e o início da mania ou hipomania (BENEDETTI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 1999; FELDMAN-NAIM *et al.*, 1997, KASPER AND WEHR, 1992; GRUBER *et al.*, 2009).

Keers *et al.* reforçam ainda mais a participação da disfunção do sono e de seus mecanismos moleculares no desenvolvimento do TAB e a recente proposição de modelos de mania baseados no desenvolvimento de animais mutantes para os genes do relógio circadiano (KEERS *et al.*, 2012) Por exemplo, camundongos mutantes CLOCK apresentaram um notável fenótipo maníaco com hiperatividade, redução do sono, diminuição dos comportamentos depressivos e redução da ansiedade. Interessantemente tais parâmetros comportamentais foram normalizados com o tratamento crônico com o lítio (ROYBAL *et al.*, 2007; JAGANNATH *et al.*, 2013). Além disso, mutantes *Afterhours*, que carregam uma mutação no gene *Fbxl3*, um regulador da degradação do

produto CRY, também mostram uma redução da ansiedade e dos comportamentos depressivos, consistentes com o fenótipo maníaco.

1.7 Processos Oxidativos e Neuroinflamatórios na neurobiologia dos transtornos de humor

Há um crescente número de evidências sugerindo que o estresse oxidativo e o metabolismo celular energético associado a processos inflamatórios crônico na periferia e no cérebro estejam estreitamente ligados à fisiopatologia de diversos transtornos psiquiátricos (BRIETZKE E KAPCINZINSKI, 2008).

A disfunção mitocondrial tem sido apontada como o principal fator da disfunção do metabolismo energético cerebral, e, frequentemente, é associado a deleções ou mutações no DNA mitocondrial (BERGER *et al.*, 2010; BUDNI *et al.*, 2013). Essas alterações podem levar á mudanças na atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), induzindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e o desbalanço entre mecanismos oxidantes e antioxidantes (BUDNI *et al.*, 2013).

Nesse contexto, alguns estudos têm focado a participação mais relevante do complexo mitocondrial I da CTE na disfunção mitocondrial, sendo, inclusive, observado uma redução na atividade desse complexo no tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com TAB, mas não no de pacientes com esquizofrenia ou depressão maior (ANDREAZZA, 2009; BERK *et al.*, 2011).

As espécies reativas de oxigênio geradas na CTE são detoxificadas pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Entretanto, quando esses sistemas são sobrecarregados pelo excesso de EROS, o dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas pode ocorrer (LENAZ *et al.*, 2000).

Nesse sentido, alterações nas enzimas antioxidantes foram relatadas no TAB. Por exemplo, observou-se que a atividade da SOD estava aumentada durante as fases maníaca e depressiva de pacientes bipolares, mas não durante a eutimia (ANDREAZZA *et al.*, 2007). Em consonância, a atividade da catalase estava diminuída em pacientes eutímicos (ANDREAZZA *et al.*, 2007), mas aumentada em pacientes maníacos não medicados (MACHADO-VIERA *et al.*, 2007). Ademais, existem evidências adicionais de que as mudanças nos parâmetros oxidativos são estágio-dependentes. A atividade da

glutathione redutase e da glutathione transferase, por exemplo, é mais acentuada nos estágios avançados da doença em comparação com pacientes nos estágios iniciais ou com indivíduos saudáveis (ANDREAZZA *et al.*, 2009).

Estudo têm mostrado que o TAB é acompanhado pelo aumento moderado dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e pelo aumento dos níveis protéicos e de RNAm para IL-1 β , NF κ B e IL-RA no córtex frontal *post-mortem* de pacientes (MAESET *et al.*, 1995; ORTIZ-DOMINGUEZ *et al.*, 2007; DREXHAGE *et al.*, 2010). Foi verificado também um aumento dos níveis de proteínas inflamatórias de fase aguda, como haptoglobina e proteína c reativa (MAES *et al.*, 1997; DICKERSON *et al.*, 2007) e de fatores do complemento, como C3 e C4, associados com o TAB (WADEE *et al.*, 2002).

Além disso, o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias também tem sido associado à disfunção do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) envolvido na fisiopatologia de várias doenças psiquiátricas (CONNOR AND LEONARD, 1998). Assim, propõe-se que tais mediadores promoveriam uma diminuição da sensibilidade aos glicocorticóides e à insulina, bem como contribuiriam para a disfunção endotelial (TSIGOS *et al.*, 2002). Este fato, em longa escala, levaria ao impacto cumulativo na regulação do eixo HPA e, posteriormente, ao aumento do risco de síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, diabetes, dislipidemia, obesidade e osteoporose (GOLDSTEIN *et al.*, 2009; RAISON *et al.*, 2006; MALETIC E RAISON, 2014). Também é importante ressaltar que o aumento de marcadores inflamatórios na periferia também tem sido associado com numerosos sintomas de transtornos do humor, como fadiga, anedonia, dificuldade de concentração, diminuição da memória verbal, ansiedade, irritabilidade, redução da interatividade social, distúrbios no sono e no apetite e, por fim, ideação suicida (ALESCI *et al.*, 2005; EISENBERG *et al.*, 2010; FELGER *et al.*, 2012; JANELIDZE *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar de reconhecida a associação de inflamação e doença psiquiátrica, pouco se sabe sobre como os mecanismos inflamatórios na etiopatogenia destes transtornos. Nesse ínterim, tem sido proposto que a ativação inflamatória, evidenciada pelo aumento dos níveis de TNF- α , seria capaz de reduzir a expressão de receptores muscarínicos M2 cerebrais (FRYER e JACOBY, 1993; HADDAD *et al.*, 1996). Níveis reduzidos desse receptor já foram identificados tanto em pacientes com

depressão maior como naqueles com TAB (GIBBONS *et al.*, 2009). Interessantemente, foi estabelecida uma relação entre os receptores M2 e a cognição humana (JONES *et al.*, 2004). Com isso, a capacidade dos processos inflamatórios de reduzir a expressão desses receptores no córtex de indivíduos com desordens de humor, fornece um interessante mecanismo pelo qual tais alterações causariam o déficit cognitivo associado a essas desordens.

Não obstante, também é intrigante que a elevação de citocinas pró-inflamatórias no SNC tem sido associada com a supressão da síntese de fatores neurotróficos e com o comprometimento da transmissão monoaminérgica (RAISON *et al.*, 2004).

Citocinas pró-inflamatórias podem ativar a micróglia, causando sua transformação fenotípica para um estado ativado. Assim, a micróglia ativada (fenótipo M1) amplifica os sinais inflamatórios pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio, citocinas e quimiocinas. Esses mediadores também causam alteração na função astrocitária. Por exemplo, citocinas suprarregulam a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) glial, resultando na maior produção de metabólitos neurotóxicos da quinurenina e de ácido quinolínico (MALETIC e RAISON, 2009; FELGER e LOTRICH, 2013; MILLER *et al.*, 2009). Ademais, os astrócitos ativados também diminuem sua produção de fatores neurotróficos, como BDNF e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), e aumentam a liberação de citocinas inflamatórias e glutamato. Assim, há maior ativação dos receptores NMDA, podendo levar à excitotoxicidade e à indução de vias pró-apoptóticas (FELGER e LOTRICH, 2013; MALETIC E RAISON, 2014). Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de transportadores de serotonina (5-HT) e de dopamina e podem depletar os estoques celulares de tetrahydrobiopterina (BH4), uma coenzima chave para a síntese de monoaminas, o que contribuiria para a disfunção da sinalização monoaminérgica (FELGER e MILLER 2012; FELGER e LOTRICH, 2013).

Nos últimos anos, também tem sido hipotetizado que algumas citocinas inflamatórias estejam envolvidas na neuroprogressão do TAB (BRIETZKE E KAPCINZINSKI, 2008). Isso tem sido baseado em evidências que mostram a ativação desses mediadores inflamatórios durante a depressão e, ainda mais proeminentemente, na mania aguda. Parte dessas mudanças não está presentes na eutímia e, portanto, tem sido hipotetizado que sejam relacionadas à ocorrência de episódios (BERK *et al.*, 2011).

Ademais, existem evidências preliminares de que a ativação inflamatória seja dependente do estágio da doença (BERK *et al.*, 2007). Nesse sentido, em um estudo de KAUER- SANT'ANNA *et al.*, (2009), as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 apresentaram-se elevadas em ambos os estágios precoce e tardio da doença, entretanto a citocina anti-inflamatória IL-10 mostrou-se elevada apenas nos estágios precoces do TAB (KAUER- SANT'ANNA *et al.*, 2009), sugerindo uma possível disfunção nos mecanismos compensatórios, no caso anti-inflamatórios, com a progressão do transtorno. Notavelmente, os níveis de TNF- α , que se mantiveram elevados durante todo o curso da doença, mostrou-se mais alto ainda nos estágios tardios dela, sugerindo que o estado inflamatório é mais perturbado com a progressão do curso da doença (KAUER- SANT'ANNA *et al.*, 2009).

1.8 Neurotrofinas

Neurotrofinas, como BDNF, bcl-2 e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) são fundamentais para a sobrevivência e proliferação neuronal. É bem reconhecida a associação entre alterações nos níveis de neurotrofinas e a fisiopatologia do TAB (KIM *et al.*, 2009), e os atuais fármacos estabilizadores do humor têm efeitos nos níveis desses mediadores. Por exemplo, o lítio induz a expressão de bcl-2 nos neurônios (SASSI *et al.*, 2002) como também aumenta expressão de VEGF pelos astrócitos (GUO *et al.*, 2009; BERK *et al.*, 2011).

Apesar disso, o papel do BDNF nos transtornos de humor tem recebido mais atenção do que os outros membros da família das neurotrofinas. Tem se proposto que o BDNF, além de ser fundamental para a sobrevivência e proliferação neuronal, também desempenha relevante papel na plasticidade sináptica e consolidação da memória de longo prazo (GRANDE *et al.*, 2010). Adicionalmente, evidências pré-clínicas sugeriram que o BDNF tem importância na regulação da liberação de 5-HT, glutamato e GABA, bem como no controle do sono de ondas lentas (FARAGUNA *et al.*, 2008; SHALTIEL *et al.*, 2007). A expressão de BDNF é, particularmente, alta no hipocampo e córtex cerebral (GRANDE *et al.*, 2010; MALETIC E RAISON, 2014).

Ademais, existem evidências de que o estresse e a excessiva e inadequada sinalização dos glicocorticóides podem interferir com a neurogênese hipocampal pelo BDNF no contexto do TAB (SCHLOESSER *et al.*, 2009). O hipocampo desempenha

um relevante papel na regulação inibitória do eixo HPA, de modo que os prejuízos à sua plasticidade pelos eventos descritos podem levar à disfunção regulatória do eixo HPA, com importantes repercussões na fisiopatologia do TAB (SCHÜLE *et al.*, 2006). Adicionalmente à regulação dos processos neuroplásticos, o BDNF também atua como um fator de resiliência, contribuindo para a maturação e diferenciação das células progenitoras nervosas (DUMAN E MONTEGGIA, 2006), e pode agir como um modulador das repostas imunes na periferia do corpo (LINKER *et al.*, 2009).

Existem três diferentes alelos do gene regulador da síntese do BDNF, de acordo com a presença de valina ou metionina na posição 66 do pró-domínio do gene: Val66Met, Val66Val e Met66Met. As variantes Met são acompanhadas por uma redução da distribuição de BDNF nos dendritos e por um prejuízo na sua secreção, sendo, portanto, considerados alelos de vulnerabilidade para transtornos de humor (CHEN *et al.*, 2008). Nesse contexto, estudos genéticos têm implicado esses polimorfismos do gene do BDNF com o maior risco para o TAB, para o início precoce da doença, rápida ciclicização, suicidabilidade e menor resposta terapêutica (POST, 2007; SEARS *et al.*, 2013; MALETIC E RAISON, 2014).

No contexto da neuroprogressão do TAB, a diminuição do BDNF tem sido reportada em episódios agudos de mania e de depressão, como também essas alterações mostram relação com a severidade dos sintomas (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2007b; FERNANDES *et al.*, 2009). Além disso, um estudo de Tramontina *et al.* (2009) demonstrou que pacientes em crises de mania que respondem efetivamente ao tratamento apresentam um aumento considerável em seu BDNF sérico após a resolução do episódio (TRAMONTINA *et al.*, 2009). Com isso, é possível suportar a noção de que os níveis séricos de BDNF seriam potenciais marcadores da atividade do TAB (BERK *et al.*, 2011).

Ademais, evidências também suportam a idéia de que as alterações das neurotrofinas no TAB sejam estágio-dependentes. Nesse sentido, Kauer-Sant'Anna *et al.* (2009) mostraram que os níveis de BDNF parecem ser normais nas fases precoces da doença em pacientes assintomáticos e diminuem com a progressão dela (KAUER-SANT'ANNA *et al.*, 2009).

1.9 Modelos Animais com base temperamental e na privação do sono

5. Base temperamental

O TAB é particularmente uma doença desafiadora para o desenvolvimento de um adequado modelo animal, devido, entre outros aspectos, à intrigante alternância entre períodos de mania/hipomania, depressão, eutimia e estados mistos que os pacientes geralmente apresentam. Com isso, muitos modelos animais têm visado refletir apenas uma validade de “face” da doença, ou seja, o comportamento depressivo ou, principalmente, maníaco e suas principais características. Nesse contexto, costuma-se caracterizar o comportamento depressivo como: anedonia, a perda de motivação, redução do apetite, insônia ou hipersônia e o prejuízo cognitivo; e o comportamento maníaco a hiperatividade motora, excesso de energia e motivação, agressividade, supressão do apetite e insônia (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004).

Vale ainda ressaltar que a validade de modelos animais para doenças psiquiátricas, e conseqüentemente para o TAB, depende fundamentalmente de sua adesão a três critérios maiores: validade de face, de construto e preditiva (ELLENBROEK e COOLS, 1990). A primeira pode ser acessada pela avaliação de quão similar as alterações desencadeadas pelo modelo são dos sintomas clínicos da doença. A validade de construto, por sua vez, é baseada na capacidade do modelo de reproduzir, consistentemente, os fatores causadores da doença, em concordância com a fundamentação teórica já existente. Portanto, esse critério de validação avalia a possível correspondência entre o modelo e as mudanças moleculares envolvidas na etiologia e fisiopatologia da condição em que estão. E, por fim, a validação preditiva baseia-se em como o modelo responde às mesmas drogas utilizadas em situações clínicas. Além disso, modelos que apresentam validade de construto, geralmente, possuem também algum grau de validade de face e preditiva (ELLENBROEK e COOLS, 1990; RUPNIAK E IVERSEN, 1993; MACHADO-VEIRA *et al.*, 2004).

Em estudos anteriores do nosso grupo foi utilizado o Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX), como um modelo animal de mania, que foi capaz de provocar alterações no comportamento (hiperlocomoção) e nas dosagens neuroquímicas (isto é, o

desequilíbrio oxidativo determinado por decréscimos nos níveis de GSH e incrementos na peroxidação lipídica em áreas do cérebro relacionadas com a fisiopatologia do TAB). Alterações que se assemelham a comportamentos análogos a mania, ou seja, validade de face e fisiopatologia, ou seja, a validade de construto em roedores. (MACÊDO *et al.*, 2013).

Ainda em estudos prévios do nosso grupo foi utilizado um modelo de mania de inibição aguda do transportador de dopamina (DAT) usando GBR12909 que foi capaz de causar alterações comportamentais e neuroquímicas como hiperlocomoção, diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo e estriado e aumento de peroxidação lipídica no cérebro. No geral esses resultados contribuíram para a validade de construto (por determinação de desequilíbrio oxidativo), bem como expandir a validade preditiva do modelo induzido por GBR12909 de mania (por determinação dos efeitos preventivos do Lítio) (QUEIROZ *et al.*, 2015).

Assim, apesar dos modelos animais atuais do TAB apresentarem ainda muitas limitações, os avanços relacionados ao entendimento dos mecanismos neurobiológicos, à etiologia, à genética e às abordagens farmacológicas têm permitido gradualmente o desenvolvimento de modelos mais sofisticados de forma similar a importantes aspectos da doença e que atingem cada vez mais os critérios necessários para sua validação.

No estudo de Piras *et al.* (2010), a partir da observação de animais selecionados com alto e baixo desempenho na tarefa de evitação na esquiwa ativa, identificou-se um padrão de diferenças de comportamento que servem como modelo animal para analisar variações genéticas que predisõem a ansiedade. Dessa forma, bons modelos animais nos possibilitam a oportunidade única de examinar profundamente os mecanismos neurobiológicos, genéticos e ambientais que predisõem aos transtornos de humor (RAY E HANSEN, 2004).

Estudos clínicos apontam uma desregulação temperamental em indivíduos com risco de transtorno afetivo. Para teve-se o cuidado de realizar uma seleção prévia dos animais com alta e baixa atividade exploratória, correspondendo a um temperamento impulsivo e curioso, e portanto o temperamento seria um importante indicador para vulnerabilidade de desenvolver episódios maníco-depressivos.

Desta maneira, fica clara a necessidade do desenvolvimento de um novo modelo animal de mania com uma proposta de aproximação clínica do curso natural do processo saúde-doença em humanos. Para isso propomos um modelo de TAB induzido por privação do sono paradoxal de base temperamental. Esse modelo tenta reproduzir situações capazes de induzir mania dentro da proposta teórica de neuroprogressão durante o curso da doença.

6. Privação do Sono

De fato, distúrbios no padrão de sono é o pródromo mais comum dos episódios de mania e também não raramente antecede os episódios de depressão (JACKSON *et al.*, 2003; GRUBER *et al.*, 2009). Alterações no padrão do sono podem precipitar episódios de humor. Nesse contexto, Bauer *et al.* (2006), acompanhou indivíduos com TAB recorrentemente maníacos, e observou que a redução em seu tempo total de sono foi seguida por uma mudança no humor no sentido da geração ou agravamento da mania/hipomania, enquanto que o aumento no tempo total de sono foi seguido por uma tendência ao estado de depressão (BAUER *et al.*, 2006). Além disso, a indução experimental de privação do sono tem sido associada com a redução de sintomas depressivos e o início da mania ou hipomania (BENEDETTI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 1999; FELDMAN-NAIM *et al.*, 1997, KASPER e WEHR, 1992; GRUBER *et al.*, 2009).

Nesse contexto, reforça ainda mais a participação da disfunção do sono e de seus mecanismos moleculares no desenvolvimento do TAB e a recente proposição de modelos de mania baseados no desenvolvimento de animais mutantes para os genes do relógio circadiano. Por exemplo, camundongos mutantes CLOCK apresentaram um notável fenótipo maníaco com hiperatividade, redução do sono, diminuição dos comportamentos depressivos e redução da ansiedade. Interessantemente tais parâmetros comportamentais foram normalizados com o tratamento crônico com o lítio (ROYBAL *et al.*, 2007; JAGANNATH *et al.*, 2013). Além disso, mutantes *Afterhours*, que carregam uma mutação no gene *Fbxl3*, um regulador da degradação do produto CRY, também mostram uma redução da ansiedade e dos comportamentos depressivos, consistentes com o fenótipo maníaco (KEERS *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, disfunção do ritmo circadiano, também tem sido implicada em transtornos de humor (KRIPKE *et al.*, 1978) e manipulações do ciclo sono-vigília, incluindo privação (PS) do sono total ou parcial ou timing (PS parcial, avanço de fase), tem efeitos profundos e rápidos sobre o humor em 60% de todos subgrupos diagnósticos de transtornos afetivos (WIRZ-JUSTICE e VAN DEN HOOFDAKKER, 1999). Wehr (1989) propôs que muitos fatores psicológicos, ambientais e farmacológicos levam a mania e causam PS. Embora 5-25% de pacientes bipolares apresentem hipomania ou mania após PS, e esta resposta é principalmente característica de termocicladores rápidos (COLOMBO *et al.*, 1999). Em indivíduos que são predispostos à doença bipolar, períodos de PS muda o sono REM (REMS) e pode desencadear o aparecimento de mania ou exacerbar os seus sintomas (Wehr de 1989) por um círculo vicioso de perda de sono e progressiva melhora do humor (BARBINI *et al.*, 1996). Assim, mania tem sido proposta como capaz de provocar desregulação do sono, e a conseqüente desregulação do sono desencadeia mania, que induz um progressivo agravamento no curso da doença (WEHR, 1989).

O método das múltiplas plataformas com tanque de água é uma técnica originalmente concebido por Jouvét *et al.* em 1964 para privação de sono paradoxal em animais (JOUVET *et al.*, 1964). Para estudos do sono ainda é amplamente utilizado porque é eficaz, econômica e não inclui qualquer manipulação invasiva do cérebro animal. É baseado na manutenção do rato em uma pequena plataforma (cerca de 7 cm de diâmetro) rodeada por água durante um tempo prolongado (geralmente 72 h). Como mencionado, o método foi originalmente projetado para privar seletivamente o animal do sono paradoxal (PSP), uma vez que quando acontece relaxamento muscular, uma característica peculiar do sono paradoxal, o animal cai na água. Além de sua ação sobre o sono, o método das plataformas provoca estresse pesado no rato, devido eventos associados como isolamento, imobilização, queda na água, imersão, etc. Portanto, este modelo experimental é uma condição estressante crônica, em que a privação do sono é apenas um componente de um generalizado estresse (COLL-ANDREU *et al.*, 1989; e KOVALZON TSIBULSKY, 1984).

Para Albert *et al.*, (1970) a presença de múltiplos estressores pode realmente até mesmo dar ao modelo uma relevância etiológica para a condição humana. No final do período de privação de sono, o rato não adormece logo que é devolvido à sua gaiola de

origem, como poderia ser esperado a partir da privação de sono prolongada, mas, sim, mostra um período de vigília de cerca de 30 min, durante o qual o animal apresenta sintomas do tipo mania-like (ALBERT *et al.*, 1970). Em particular, durante esta meia hora ou assim que o animal apresentar insônia, um elevado grau de hiperatividade, irritabilidade (definida como agressividade) induzida por estimulação, e agressividade (HICKS *et al.*, 1979), hipersexualidade (MORDEN *et al.*, 1968) (Comportamento de montagem homossexual) e estereotipia (Elevação, sniffing).

A susceptibilidade para desenvolver mania durante a privação do sono paradoxal parece envolver uma sensibilidade diferente a alterações neuroquímicas em áreas específicas do cérebro (EBERT *et al.*, 1994; SALOMON *et al.*, 1994)

O cérebro é o principal regulador neuroendócrino, autonômico e imunológico, juntamente com comportamentos que contribuem para estilos de vida insalubres ou saudáveis, que, por sua vez, influenciam os processos fisiológicos de alostase (MCEWEN, 1998). A capacidade para alcançar a estabilidade através mudanças adaptativas é chamada alostase (MCEWEN e STELLAR, 1993). Alterações na função cerebral por estresse crônico pode, portanto, ter efeitos diretos e indiretos sobre a sobrecarga alostática cumulativa. Sobrecarga alostática resultante de estresse crônico em modelos animais provoca atrofia dos neurônios no hipocampo e no córtex pré-frontal, regiões do cérebro envolvidas na memória, atenção seletiva, e função executiva, e provoca a hipertrofia dos neurônios na amígdala, uma região do cérebro envolvida no medo e ansiedade, bem como a agressão. Assim, a capacidade de aprender e lembrar e tomar decisões pode ser comprometida pelo estresse crônico e pode ser acompanhada de aumento dos níveis de ansiedade e agressividade (MCEWEN, 2004).

Embora a privação do sono ainda não foi estudada em relação a todos estes aspectos, há cada vez mais evidências não só de comprometimento cognitivo resultante da restrição de sono, mas também para níveis alterados de citocinas, marcadores de estresse oxidativo, os níveis de glicogênio, e as mudanças estruturais na forma de dentadas reduzida giro neurogênese (MCEWEN, 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho não é só a caracterização do temperamento em roedores, mas também investigar as possíveis diferenças de expressão gênica e

associar com características do temperamento. E por fim propor um novo modelo de bipolar induzido por privação do sono paradoxal de base temperamental.

1.10 Justificativa e relevância

O temperamento é um fator determinante para o desenvolvimento e/ou manifestação dos transtornos psiquiátricos (CLONINGER *et al.*, 1994; LARA *et al.*, 2006). Além disso, várias evidências sugerem que parte do componente biológico da maioria dos transtornos mentais parece estar relacionada aos traços de temperamento ou padrão emocional básico (CLONINGER *et al.*, 1998; MUST *et al.*, 2007, LAUCHT *et al.*, 2007; BENJAMIN *et al.*, 1996; EBSTEIN *et al.*, 1996; LARA *et al.*, 2012). De fato, exploração e busca de novidade são comportamentos adaptativos que estão desregulados no TAB e são aspectos críticos da doença. Em função disso, é importante identificar fatores biológicos associados às distintas características do temperamento, como diferenças na expressão gênica e marcadores neuroquímicos para ajudar a dar mais evidências relacionadas à etiopatogenia de transtornos mentais como o TAB, contribuindo para um melhor diagnóstico clínico e acompanhamento de pacientes. Para tais fins, avaliamos a expressão gênica no hipocampo de ratos com traços de alta e baixa atividade exploratória. Além disso, há evidências de que o ambiente também influencia o temperamento, mas poucos estudos enfatizaram o impacto da contingência ambiental privação do sono sobre traços temperamentais.

Assim, o entendimento das bases neurobiológicas e genéticas do temperamento com base em modelos animais pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia de vários transtornos psiquiátricos e, conseqüentemente, para o desenvolvimento ou aprimoramento de estratégias preventivas, terapêuticas e diagnósticas.

A caracterização do temperamento tem sua importância apoiada no fato de que os modelos atuais de psiquiatria baseiam-se no diagnóstico dos transtornos de humor sem levar em conta a personalidade. Apesar da relevância conceitual e da necessidade prática de se acessar as variáveis do temperamento em populações clínicas e não clínicas, as classificações oficiais não incluem especificações para os temperamentos afetivos (até porque o DSM-IV e a CID-10 visam aos estados mórbidos) (FERREIRA, 2013).

Nesse contexto, o estudo do temperamento afetivo, suas bases genéticas e sua influência na caracterização e no tratamento dos transtornos de humor, torna-se um instrumento em direção a essa proposta de psiquiatria personalizada baseada em evidências.

Portanto, a caracterização do temperamento afetivo pode ser uma ferramenta clínica útil no contexto das manifestações psicopatológicas do humor, por exemplo, identificando na avaliação de um paciente já acometido por um transtorno clínico ou psiquiátrico, variáveis que podem implicar na evolução e tratamento. Em um quadro depressivo, a exemplo, muita ênfase é dada à escolha do antidepressivo, suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, obviamente importantes, porém faz-se necessário atentar para características particulares da constituição da personalidade de quem recebe o medicamento.

Vale destacar que transtornos mentais como o TAB têm prevalência estimada em cerca de 1% da população mundial, entretanto estudos, como o de Akiskal *et al.* (2000) têm mostrado taxas tão altas como 5% dessa população. Tal incremento tem sido atribuído não ao aumento do diagnóstico de casos clássicos e facilmente reconhecidos de TAB, mas sim de várias outras condições, tidas como suaves ou menos severas, que, atualmente, são incluídas no espectro da bipolaridade (AKISKAL *et al.*, 2000). Neste contexto pesquisas ajudando a elucidar a etiopatogenia deste transtorno, bem como que possam contribuir para a psiquiatria personalizada são de grande valia, o que se pretende com a realização do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar alterações geno-fenotípicas em ratos adultos com elevada e baixa atividade exploratória expostos ou não à privação de sono paradoxal na adolescência.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar os animais em alto (HE) e baixo exploratórios (LE);
- Determinar alterações relacionadas a comportamento exploratório, depressivo, de risco, anedonia e cognição em animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal;
- Verificar a expressão de genes do relógio biológico CLOCK, Bmal1, PER1, PER2, CRY1, CRY2 através da técnica de qPCR no hipocampo de animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal;
- Avaliar a expressão gênica e proteica de DRD2 (por imunoblotting) e expressão gênica da triptofano hidroxilase 2 (Tph2) no hipocampo de animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal;
- Determinar alterações no estresse oxidativo (mensurando os níveis de GSH e de MDA), inflamatórias (IL-1 β , de IL-6 e IL-4 e de nitrito e expressão gênica de iNOS) em animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal;
- Verificar alterações nos níveis da neurotrofina BDNF em animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal.
- Verificar alterações nos níveis de corticosterona (estresse) em animais HE e LE expostos ou não à privação do sono paradoxal.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos 35-37 dias após o nascimento (PN) ou periadolescentes de acordo com Frantz et al. (2007), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos a um ciclo claro/escuro inverso de 12 h e ambientados em grupos de 6 animais com livre acesso a comida e água.

O período peripuberal do animal, ou seja, 30 a 40 dias de vida correspondem aproximadamente à idade de 8 a 14 anos nos seres humanos. Este período de desenvolvimento no rato foi selecionado porque ele é conhecido por ser altamente sensível a mudanças na reatividade ao estresse e sensibilidade a estímulos emocionais durante a transição do meio da infância para a adolescência, precipitando o aparecimento de psicopatologia entre os indivíduos vulneráveis, contribuindo assim para o aumento de distúrbios psicológicos afetivos e outros vistos entre a infância e a adolescência (SPEAR, 2000, 2009).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa animal (CEPA) da UFC sob número 125/14 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

7. Separação comportamental em ratos alto exploratório (HE) e baixo exploratório (LE)

A seleção dos animais com base no comportamento exploratório é uma ferramenta útil para estudar as bases biológicas do temperamento e personalidade. O pressuposto básico é que o padrão de comportamento exploratório resulta de uma combinação de evitação de dano (medo) e de busca de novidade (curiosidade). Com base nessas diferenças de comportamento inter-individuais, uma seleção psicogênica foi empregada para estudar as bases do temperamento em roedores, dividindo-os em extremos de atividade exploratória

(STEIMER, DRISCOLL; 2005, MALLO, 2007). Os animais periadolescentes no 30º dia pós-natal (PN30) foram selecionados de acordo com o desempenho por 10 min no campo aberto (*open field*), o que possibilitou distinguir dois grupos de ratos, dispostos a representar extremos de temperamento, ou seja, os ratos HE e LE baseado nos valores de rearing ou atividade exploratória vertical (THIEL, 1999) e analisados através do percentil 25% e 75%.

Nesse contexto, oitenta ratos foram testados e destes foram selecionados a partir de cada extremo de comportamento exploratório (os mais e os menos exploradores) 20 e 21 animais para compor os grupos HE e LE, respectivamente. Estes 41 animais foram testados novamente na fase adulta e permaneceram com o mesmo perfil exploratório.

Para tanto foi necessária uma quantidade prévia maior de animais para triagem dos ratos com base na sua atividade exploratória. Já os animais que não atenderam a esse critério foram devolvidos ao biotério para enquadramento em outros experimentos. Vale ainda destacar que o teste empregado para triagem dos animais HE e LE se deu a partir dos valores de levantamentos verticais no campo aberto e analisados através do percentil, e que além de ser consideravelmente pouco duradouro, apenas dez minutos, não oferece, seja pelo tempo do experimento ou pela sua própria natureza, grande potencial estressante aos animais. Ademais, os animais utilizados nesse estudo foram aqueles com nítido padrão extremista de atividade exploratória, de modo que a maioria dos animais devolvidos ao biotério encontrava-se entre os padrões de normalidade (medianos) para esse parâmetro comportamental.

Após a seleção temperamental os animais tiveram 10 dias de descanso antes de atingirem a idade PN40 e foram submetidos à contingência ambiental

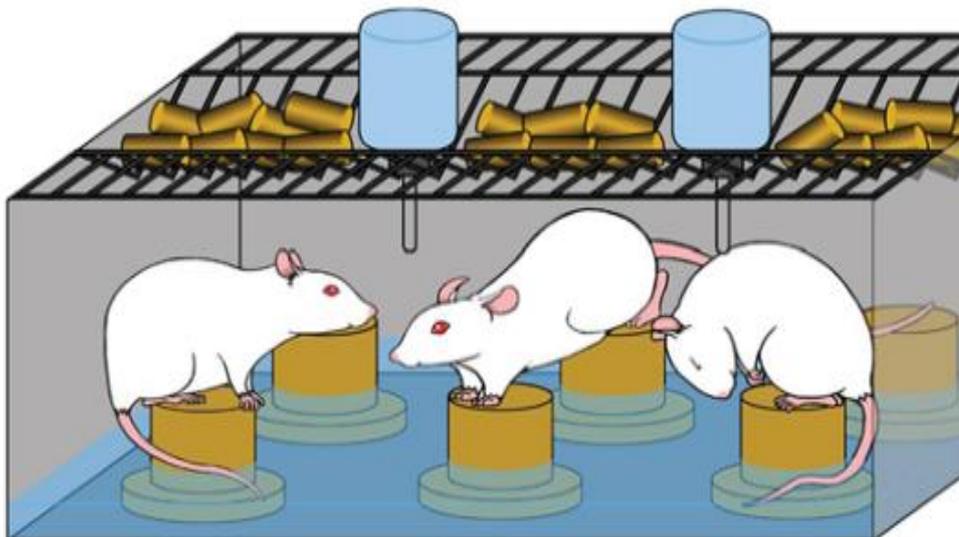
3.2 Modelo de privação do sono paradoxal

Os animais foram submetidos à privação do sono paradoxal usando o método de Andersen (2004) de plataformas múltiplas modificadas que consiste em colocar quatro sujeitos experimentais em um tanque cilíndrico (48,5 cm x 23 cm) contendo 5 a 6 plataformas altas espaçadas (6,0 cm x 6,0 cm), com o nível da água 1 cm abaixo da sua superfície (Figura 5). Para isso o cilindro é preenchido com 2l litros de água distribuídos homogeneamente. O número de plataformas maior que o de animais permite que o animal possa mover-se de uma plataforma para outra. A atonia muscular presente no sono paradoxal faz com que o animal acorde ao encostar o focinho ou, ainda, o corpo inteiro na água. Os animais controles permanecerão em suas caixas-moradia no mesmo ambiente onde será realizada a privação de sono.

Ao final da privação do sono (duração 10 dias), os animais estavam no PN50 ou na idade de adulto jovem. A partir deste ponto foi realizado um intervalo de 10 dias sem tratamento, no qual o animal atingiu o PN60 que corresponde à sua fase adulta. Assim foi avaliado o caráter temporal das possíveis alterações comportamentais e neurobiológicas causadas pelo estresse da privação do sono paradoxal.

Os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliar atividade locomotora e exploratória; cognição; comportamento de risco e ansiedade e depressão. Após análise dos dados comportamentais, os animais que apresentaram alterações comportamentais tiveram seu sangue analisado para avaliação dos níveis séricos de corticosterona (eixo HPA) e interleucinas inflamatórias. Também foi removida a área cerebral hipocampo, por ser uma área fortemente associada a transtornos de humor para as demais análises descritas adiante.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do método de privação do sono paradoxal por múltiplas plataformas modificado.

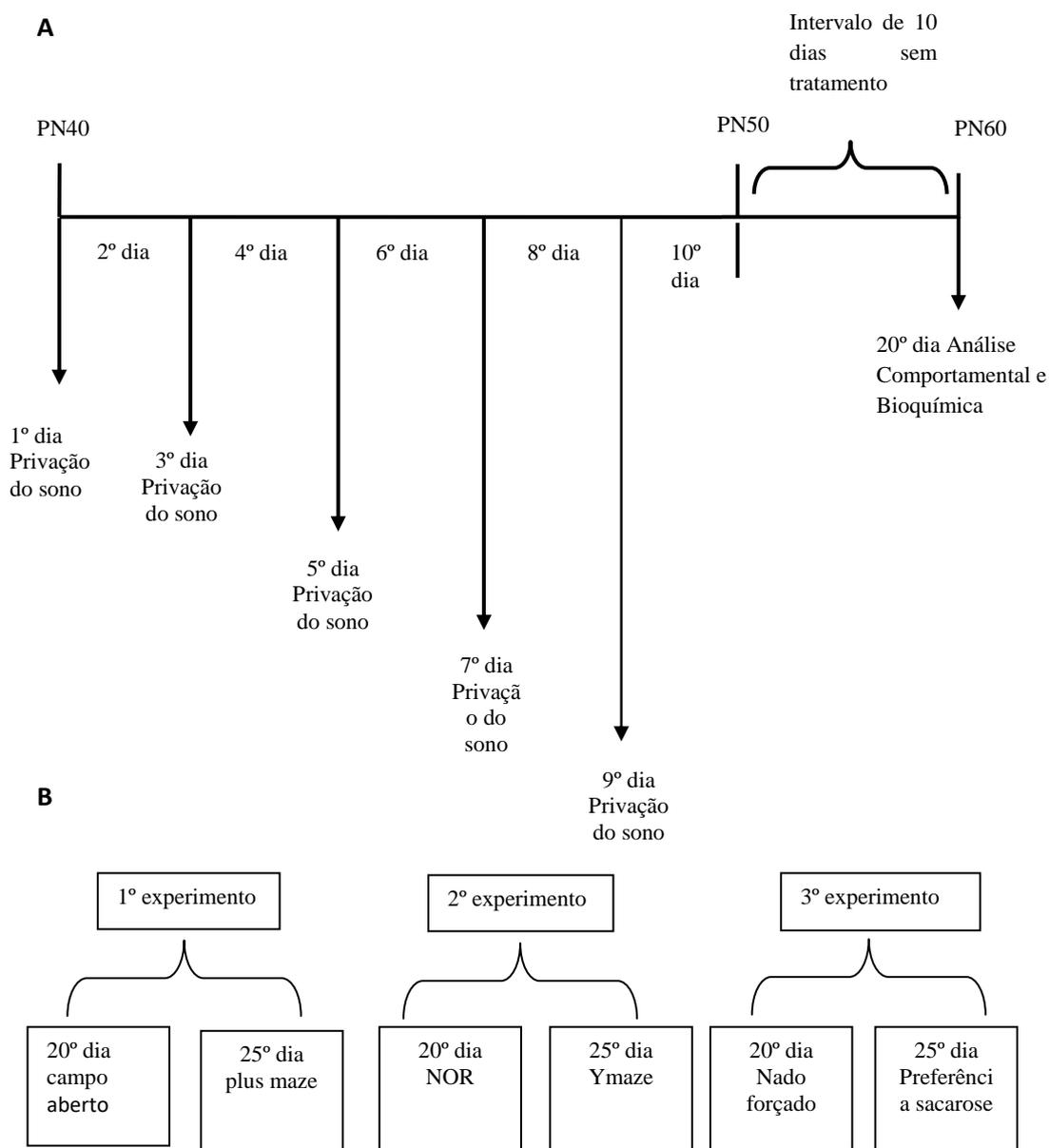


Fonte: COELHO, 2009

3.3 Desenho Experimental

A etapa inicial envolveu a avaliação da influência do temperamento: HE e LE sob exposição ao modelo de privação do sono paradoxal. Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais: i) grupo controle (n=32), ii) ratos privados do sono paradoxal durante 24 horas (n=32).

Figura 6 – Diagrama representativo do protocolo de privação do sono paradoxal



Fonte: Do próprio autor.

A. Representação do tempo de exposição ao modelo Privação do sono paradoxal (PSP).

B. Testes comportamentais realizados

3.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados entre 10 e 16 horas. Os animais foram transportados para a sala de comportamento nas suas caixas-moradia e foram manipulados pela base da cauda em todos os momentos. Eles permaneceram nessa sala por pelo menos 24 horas antes do início dos testes para ambientação. Durante os testes de comportamento, o ambiente foi mantido com baixa luminosidade (luz vermelha: 12 lux).

8. Parâmetros comportamentais testados em animais baixo e alto exploratórios

9. Campo Aberto

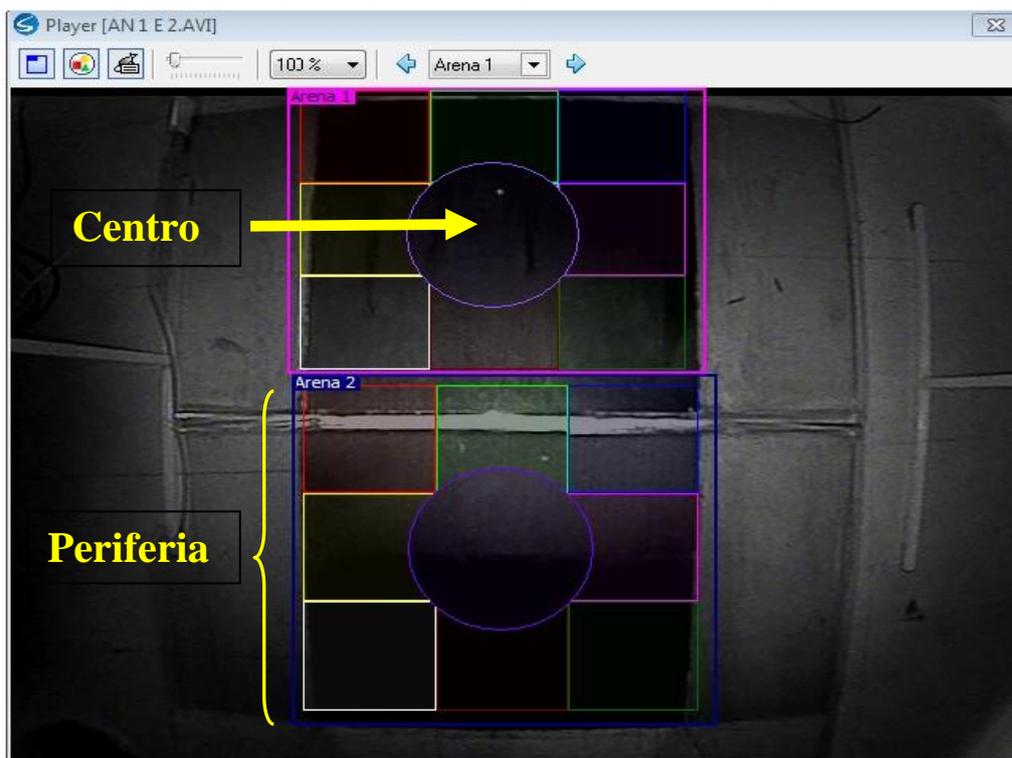
O teste do campo aberto foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais, bem como identificar comportamentos like ansiedade ou depressão. (PRUT; BELZUNG, 2003). O teste foi realizado em uma arena (50 X 50 cm) cercada por paredes de acrílico, com o chão na cor preto dividido em 5 quadrantes (Figura 7), A atividade exploratória do animal foi registrada durante 10 minutos e foi obtido o mapa da trajetória percorrida por cada animal na arena. Com o apoio do software foram avaliados automaticamente os seguintes parâmetros: Tempo gasto em segundos (s) no quadrante central; A relação entre a atividade locomotora no quadrante central e nos quadrantes da periferia da arena (Relação C/P); O tempo de imobilidade em segundos (s) e o número de transições entre os quadrantes da arena. Além disso, o número de levantamentos verticais ou rearings (número de vezes que o animal ergueu-se nas patas traseiras ou atividade locomotora vertical) foram contados por meio da observação comportamental, independentemente de ter ou não ocorrido apoio do animal nas paredes. O teste foi realizado em uma sala com som atenuado, na condição de baixa intensidade de luz vermelha, gravado e analisado utilizando o *software SMART video tracking* versão 3.0.03 da Panlab Harvard Apparatus®.

Os roedores, espontaneamente, preferem a periferia do aparato à atividade exploratória na região central da arena e esse comportamento é denominado tigmotaxia (CAMPOS *et al.*, 2013). Dessa forma, são resultados indicativos de atividade ansiolítica: o

aumento da permanência do animal na região central do aparato e a elevação da razão entre o tempo gasto em atividade no centro e o tempo em atividade total (PRUT; BELZUNG, 2003).

Após o teste, os animais foram devolvidos às suas caixas-moradia e foi realizada a assepsia do campo aberto com álcool etílico a 15% entre um animal e outro.

Figura 7 – Foto do aparato para realização do teste do campo aberto



Fonte: Do próprio autor.

Foto da tela de captura do software mostrando as arenas utilizadas para o teste. Pode-se observar que a arena à esquerda encontra-se dividida em 5 quadrantes com regiões central e periférica identificadas.

10. Labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*)

O labirinto em cruz elevado originalmente descrito por Pellow (1985) foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre o comportamento de risco e ansiedade dos animais. Após 24 horas dos testes no campo aberto, os animais foram testados no plus-maze. O aparelho foi construído em acrílico e coberto por fórmica preta, e consiste em dois braços abertos opostos (50x10 cm), e dois braços opostos fechados (50x10 cm). Os quatro braços estão elevados 50 cm do chão (Figura 8). O animal é colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início do experimento. Foi registrado o tempo de permanência do animal em cada braço (TEBA e TEBF) e o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e fechados (NEBF), durante 5 minutos. O experimento foi realizado numa sala de comportamento isolada de ruídos e com baixa iluminação.

Figura 8 - Desenho representativo do aparato para o teste plus maze

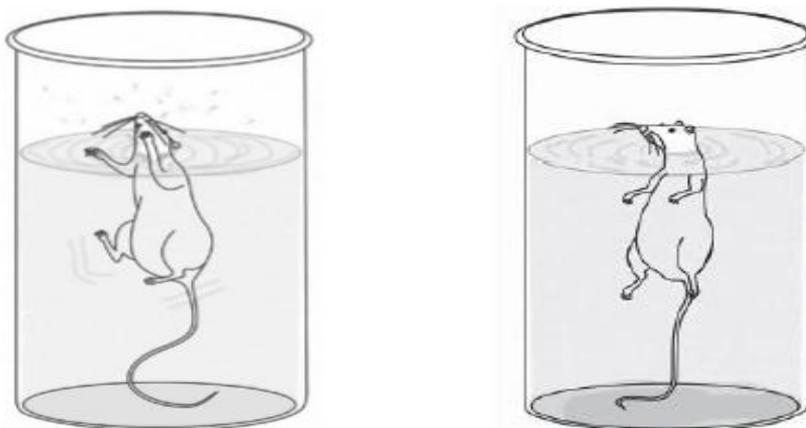


11. Testes para avaliação do fenótipo depressivo

12. Teste do nado forçado

O Nado forçado foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da “privação do sono paradoxal” e “padrão exploratório” sobre comportamentos análogos à depressão. O teste do nado forçado, descrito primeiramente por Porsolt, (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1978) é um dos testes mais utilizados na investigação de novas drogas antidepressivas. Os animais foram adaptados 24 horas antes da fase de teste. Na fase de teste, os animais foram inseridos individualmente em cilindros de acrílico (60 cm de altura; 22,5 cm de diâmetro), contendo água da altura de 35 cm do solo do aparato (Figura 9), por um período de 10 minutos no qual foi cronometrado o tempo total de imobilidade para cada animal. Considerou-se como imobilidade quando o animal fez apenas movimentos mínimos necessários para se manter acima do nível da água. O teste avaliou o comportamento do animal frente a uma situação inescapável, atuando como modelo preditivo de depressão. E espera-se que o animal com fenótipo depressivo apresente tempo de imobilidade superior ao animal saudável.

Figura 9 - Desenho representativo do aparato para o teste do nado forçado



Fonte: QUEVEDO *et al.*, 2013.

13. Teste da preferência pela sacarose

O teste de preferência pela sacarose foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos da “privação do sono paradoxal” e “padrão exploratório” sobre as medidas de anedonia nos animais com comportamentos depressão-símile (MAO *et al.*, 2009). Os animais passaram por uma etapa de adaptação com a solução de sacarose 1% da seguinte forma: 72 horas antes do teste, foram colocadas, em cada gaiola, duas garrafas com solução de sacarose 1% p/v e 24 horas depois, uma das garrafas de sacarose 1% foi trocada por uma garrafa contendo água. Depois da adaptação, os animais foram privados de água e comida por 24 horas. O teste foi realizado após 24 horas de jejum, com os animais alocados em gaiolas separadamente e tendo livre acesso a duas garrafas contendo 100 ml de solução de sacarose 1% e 100 ml de água cada uma. Após 1 hora, os volumes de solução de sacarose 1% e de água foram medidos e a preferência pela sacarose foi calculada em valores percentuais, através da razão entre o volume consumido de sacarose 1% e o volume consumido total somando-se os volumes de sacarose 1% e água e multiplicando o resultado dessa razão por 100, como mostra a equação a seguir:

$$\text{Preferência pela Sacarose}(\%) = \frac{\text{Consumo de Sacarose (ml)}}{\text{Consumo de Sacarose (ml)} + \text{Consumo de Água(ml)}} \times 100$$

14. Testes para Avaliação da Cognição

Os testes foram realizados 24 horas após análise dos parâmetros comportamentais relacionados ao fenótipo maníaco dos animais, e seguiram também com um intervalo de 24 horas entre cada um deles. Vale ainda destacar que esse período de tempo se refere exclusivamente ao intervalo entre os testes, não dizendo respeito ao tempo total que possa vir a ser utilizado na efetuação do protocolo completo de cada procedimento, incluindo, por exemplo, os tempos de habituação e treinamento que possam ser necessários.

15. Teste labirinto em Y (Y-maze)

O labirinto em Y foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre memória de trabalho (working memory) e aprendizado, sendo conduzido conforme descrito previamente (YAMADA *et al.*, 1996). O labirinto em Y é constituído de três braços idênticos (75,5 cm de comprimento, 34,5 cm de altura e 11,7 cm de largura), dispostos a 120° um do outro, formando um triângulo central (Figura 10). Os animais foram colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços foi registrada durante oito minutos. A alternância foi definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231). O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Após o teste, os animais foram devolvidos às suas caixas-moradia e realizado a assepsia do labirinto em Y com álcool etílico a 15% entre um animal e outro.

Assim, a porcentagem das alternações foi calculada como a razão entre as alternações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alternações espontâneas} = n / n-2 \times 100$$

Figura 10 - Desenho representativo do aparato para o teste Labirinto em Y



16. Teste de exploração do objeto novo (NOR)

O NOR foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre capacidade de memorizar e reconhecer objetos, novos, e já conhecidos. O reconhecimento do objeto novo é baseado na avaliação das diferenças de tempo de exploração de objetos novos e familiares. Embora parâmetros como atenção e ansiedade também possam ser avaliados por esse teste (GOULART *et al.*, 2010; SILVERS *et al.*, 2007), ele tem sido amplamente utilizado para investigação de alterações na memória, sobretudo no que diz respeito à memória de reconhecimento, e para esse fim será utilizado nesse estudo. Além disso, nos deteremos na avaliação da memória de reconhecimento de curta duração.

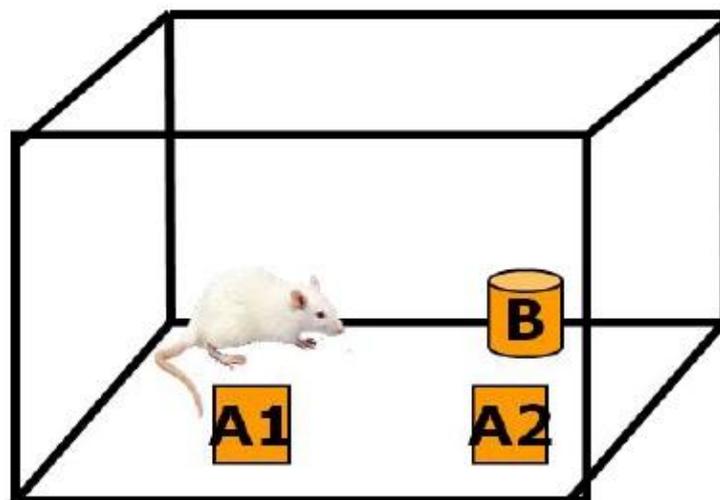
O teste consiste em três etapas: habituação, familiarização e fase teste executadas de acordo com Ennaceur e Delacour *et al.*(1988) e adaptadas por Tagliabata *et al.* (2009), que serão discriminadas a seguir.

Cada animal foi, primeiramente, habituado em uma arena de campo aberto vazia de dimensões 300 x 300 mm, com paredes 150 mm de altura e feita material acrílico transparente. Essa etapa consistiu de duas sessões de 10 minutos de duração, separadas entre si por um intervalo de 24 horas. Após 24 horas da última sessão de habituação, os animais foram submetidos à fase de familiarização, na qual foram expostos exatamente no meio da caixa, paralelos, e a 10 cm das paredes laterais a dois objetos iguais A1 e A2 de brinquedo de Lego duplo (Figura 11), denominados de objetos familiares, por 20 segundos de exploração desses objetos, após o qual essa fase encerra. Nesse contexto, Ennaceur e Delacour (1988) definiram como exploração o direcionamento do focinho para o objeto a uma distância de 2 cm ou menos dele, como também tocá-lo com o focinho ou cheirá-lo. Depois disso, os animais retornaram para suas caixas moradia e, após um período de 2 minutos, eles retornaram para a arena, na qual dois objetos, um idêntico ao familiar (mas não previamente usado) e outro novo. Assim, foi permitido aos animais explorarem o ambiente por 10 minutos, durante o qual a quantidade de tempo explorando cada objeto foi registrada. Os objetos familiar e novo foram alternados de posição para cada animal testado, e os objetos e a arena foi limpa com álcool 70-75% entre os ensaios.

Para a análise dos resultados foi utilizado o índice de reconhecimento que é calculado pela fórmula $TB1 - TA1 / TE$ onde TB1 é o tempo gasto pelo animal para explorar o objeto novo. TA1 é o tempo gasto para explorar um objeto familiar, que já é conhecido do animal, e TE é o tempo de exploração total somatória do tempo de exploração do animal no objeto novo e antigo.

(Tempo explorando o objeto específico/ tempo total usado na fase teste)

Figura 11 - Desenho representativo do aparato para teste NOR



Fonte: IZQUIERDO, 2006

3.5. Investigação dos endofenótipos genéticos Expressão Gênica por qPCR.

18. Preparação das amostras

Os fragmentos de hipocampo dos animais foram retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados foram adicionados em microtubo com 300µL de RNA *later* (Sigma, EUA). Em seguida, foram armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

19. Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com 100 µL tampão de lise foram misturadas cinco vezes por inversão. Adicionou-se às amostras 350 µL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo. Adicionou-se 200 µL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionou-se 600 µL de solução de lavagem e em seguida os tubos foram centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 µL de DNase *stop solution* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, inseriu-se tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Adicionou-se 250 µL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 µL de H₂O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA extraído foi armazenado no freezer -70°C.

Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1µL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific,

EUA). Concomitante a dosagem em ng/ μ L, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

20. Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, USA). O volume final de cada amostra foi de 20 μ L: 2 μ L do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 μ L de oligonucleotídeos; 2 μ L de primer; 1 μ L da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em μ L foi dependente da concentração inicial extraída; H₂O de nucleases para completar 20 μ L. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR.

21. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todos os primers utilizados e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

Os valores de *Threshold cycle* (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Office Excel Microsoft 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Quadro 2 - Primers utilizados forward e reverse para análise de q-PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
CLOCK	ATGGGAATCCTTCGACACAG	GACCTTGGAAGGGTCAGTCA
Bmal1	CCACAGCACAGGCTACTTGA	GCTGTGGAACCATGTGTGAG
PER 1	GCTGCTCCTACCAGCAAATC	AGGAGGCACATTTACGCTTG
PER 2	TTGTGCCTCCCGATGATGAA	AGTGGGCAGCCTTTTCGATTA
Cry 1	GATTGACGCCATCATGACAC	CATCCCTTCTTCCCAACTGA
Cry 2	GGGACTACATCCGGCGATAC	ACTTAGCGGCCTTCTGAACC
Drd2	CAGTGTTAGCTTGGCTCGATGCC	TCCCTGCTTTCCTATGTGGTTCCT
Tph2	TGCTCAAGTTTCAGACCACCA	CCACGGCACATCCTCTAGTT
INOS	AGGCCACCTCGGATATCTCT	TGGGTCCTCTGGTCAAACCTC

Fonte: Elaborado pela autora

3.6 Expressão protéica do receptor DRD2

Para avaliar a expressão protéica de DRD2 hipocampal realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e *Western Blotting*.

22. Extração de proteínas.

O hipocampo foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 100 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

23. Método Bradford para dosagem de proteína.

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 µL de amostra e 40 µL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

24. Western Blotting.

Inicialmente, preparou-se 50 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos rat anti- Dopamine DRD2 IgG primary antibody (1:1000; Abcam, USA) e rat anti-α- tubulin IgG primary antibody (1:4000; Sigma, USA) diluídos em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 10 min cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ImageQuant 300 Imager (GE

Healthcare, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.7 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

25. Preparação de tecido

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas (10 vezes (w/v) arrefecidas com gelo, com 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes foram separados e usados para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

26. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram quantificados com o objetivo de avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre o sistema antioxidante e para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado será recolhido e os níveis de GSH determinados (SEDLAK *et al.*, 1968). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH/g de tecido úmido.

27. Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos foi quantificada com o objetivo de avaliar os efeitos da interação entre “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre a peroxidação lipídica. As

amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturados com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica será determinada por absorbância a 535 nm e expressa como mmol tecido malonaldeído (MDA) / mg de proteína (OHKAWA *et al.*, 1979).

28. Determinação dos níveis de Nitrito

Para avaliar os efeitos do “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” na neuroinflamação foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros dos camundongos imediatamente após a decapitação em todos os grupos. Após centrifugação (800 × g/10 min), o sobrenadante do homogeneizado foi coletado e a produção determinada com base na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981, RADENOVIC *et al.*, 2005). Para esse experimento 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1% / cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / ácido fosfórico a 5% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do sobrenadante do homogenato tecidual e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do tampão usado para o homogenato e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm, expressa em nM de nitrito/g de tecido úmido.

3.8 Dosagem de BDNF hipocampal e de citocinas (IL1β, IL-4, IL-6) no hipocampo e plasma

29. Preparo das amostras para a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para as análises plasmáticas antes e após o tratamento foram realizadas coletas de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro para determinação das análises plasmáticas (corticosterona e interleucinas). Com o objetivo de eliminar os efeitos do estresse sobre as dosagens e promover conforto ao animal, os

ratos estavam sob efeito da anestesia local da lidocaína (50 mg/g) e sob cuidados de assepsia. A coleta se deu 10 min após a indução da anestesia local e obedeceu a horários fixos pela manhã.

Para garantir a sobrevivência dos animais, a amostra não excedeu 10% do volume total de sangue, que corresponde a 6% de seu peso (em torno de 2 ml). Para isso, apenas 800 µL de amostra de sangue foi coletada pela via retroorbital. O sangue foi colocado em tubos de ensaio contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos, coletados o sobrenadante, e subsequentemente, armazenadas a -70C.

Para as análises das amostras teciduais foram homogeneizadas a 8 e 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 para citocinas e BDNF, respectivamente.

30. Técnica de ELISA

Os níveis de BDNF (neuroplasticidade) e de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias IL1 β , IL-4, IL-6 foram quantificados no hipocampo e plasma por ELISA para avaliar os efeitos do “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” na neuroinflamação. A detecção das citocinas foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (Kit DuoSet (R&D Systems, EUA)). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL1 β ou IL-6 ou IL-4 ou BDNF por 18h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-6 ou TNF- α em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D

Systems, EUA) foram adicionadas em cada poço e incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H₂SO₄). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

31. Determinação dos níveis de corticosterona plasmáticos

Os níveis de corticosterona foram quantificados com o objetivo de avaliar os efeitos “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre alterações no eixo Hipótalamo-Hopófise-Adrenal (HPA). Os níveis plasmáticos de corticosterona foram determinados utilizando um kit comercial de ELISA (R&D Systems®, EUA). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 1h à temperatura ambiente sobre um agitador de microplacas com 50 µL por poço de anticorpo de captura para corticosterona. Posteriormente, as placas foram lavadas quatro vezes com 400µL de tampão de lavagem e adicionado 100 µL do pré-tratamento F a cada poço, em seguida 50 µL do padrão ou amostra nos poços apropriados, 50 µL do diluente calibrador aos poços zero e curva padrão foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições. Seguiu-se a incubação com 50 µL de corticosterona conjugada em temperatura ambiente no agitador por 2 horas. Após o período de incubação, as placas foram lavadas novamente por quatro vezes com 400 µL de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos com 200 µL de solução substrato para revelação. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H₂SO₄) e a absorbância medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software* GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Para a seleção temperamental, os valores foram expressos como média ± SD, teste-*t de student* e sob a forma de mediana e escala percentilar para seleção dos extremos de temperamento, sendo que os animais foram classificados em LE de acordo com o rearing com pontuação ≤ ao percentil 25% e os animais HE aqueles com pontuação

de comportamento \geq percentil 75%. Os outros resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey como teste *post hoc* para comparações múltiplas e expressas como média \pm EPM. Para a análise estatística dos fatores “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” foram considerados o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Após triagem dos ratos no campo aberto ($N = 80$) foram selecionados 20 animais alto exploratórios (HE) e 21 animais baixo exploratórios (LE) correspondendo, portanto, aos extremos de temperamento. O animal acima do percentil 75% foi classificado em HE por possuir maior porcentagem de levantamentos verticais em comparação aos animais abaixo do percentil 25%, ou seja, LE. [(HE $80,60 \pm 9,992$, $N=20$); (LE $21,90 \pm 7,549$, $N 21$) médias \pm SD; $t = 21,29$, $df=39$, $P < 0,0001$, $N 41$].

A distribuição dos valores do ponto de corte superior e inferior foram HE $> 67,25\%$ e para o grupo LE $< 32\%$ correspondendo, respectivamente, ao percentil 75% e 25%.

Os 39 animais restantes com percentual de *rearings* entre 32% e 67,25% no campo aberto foram considerados medianos e não entraram no estudo. A fim de confirmar que esses traços comportamentais seriam estáveis ao longo do tempo, a mesma tarefa foi realizada um mês depois, com os animais já adultos PN60. Com efeito, no PN60 os animais selecionados para os grupos HE e LE permaneceram com a mesma distribuição em um segundo ensaio [(HE $23,00 \pm 5,635$, $N=9$), (LE $5,750 \pm 1,832$ $N=8$) Média \pm SD; $t = 8,254$, $df=15$, $P < 0,0001$, $N 17$; (HE PSP $85,75 \pm 9,823$, $N=8$), (LE PSP $26,20 \pm 4,658$, $N=8$) Média \pm SD, $t=12,55$, $df=11$, $P < 0,0001$, $N 16$)

Tabela 1- Valores mínimo, máximo, mediana, média, desvio padrão, percentil 25 e 75% da divisão temperamental dos animais.

Mínimo	Percentil 25%	Mediana	Percentil 75%	Máximo	Média	Desvio padrão
3,000	32,00	46,00	67,25	101,0	48,59	22,91

4.1 Testes Comportamentais

4.1.1. Alterações comportamentais em ratos HE e LE submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal

A avaliação da interação entre os fatores “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” por ANOVA duas vias revelou efeitos significativos sobre o crossing [F (1, 18) = 26,46, P < 0.0001] e rearing [F (1, 26) = 79,74, P < 0.0001].

Na figura 13 o teste *post hoc* revelou diferenças significativas no campo aberto entre ratos HE quando comparados com ratos LE ($p < 0.001$). Já os animais HE privados de sono paradoxal apresentaram hiperlocomoção quando comparados aos HE não privados ($p < 0.001$). Em contraste com estas medidas, os ratos LE expostos à privação do sono paradoxal não alteraram sua locomoção. Houve diferenças significativas entre ratos HE e LE submetidos à privação do sono paradoxal ($p < 0.0001$).

Na avaliação dos levantamentos verticais houve diferenças entre ratos HE vs. LE ($p < 0.0001$). Neste caso os ratos HE exibiram significativamente maior frequência de levantamentos verticais. Os animais HE privados de sono apresentaram aumento significativo da frequência de rearings quando comparados aos HE não privados ($p < 0.001$). Da mesma forma que ratos LE privados de sono aumentaram de forma significativa os levantamentos verticais quando comparados aos não privados ($p < 0.001$). Após a exposição à privação de sono os ratos HE apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de rearings quando comparados aos LE submetidos à privação de sono ($p < 0.0001$) Figura 14.

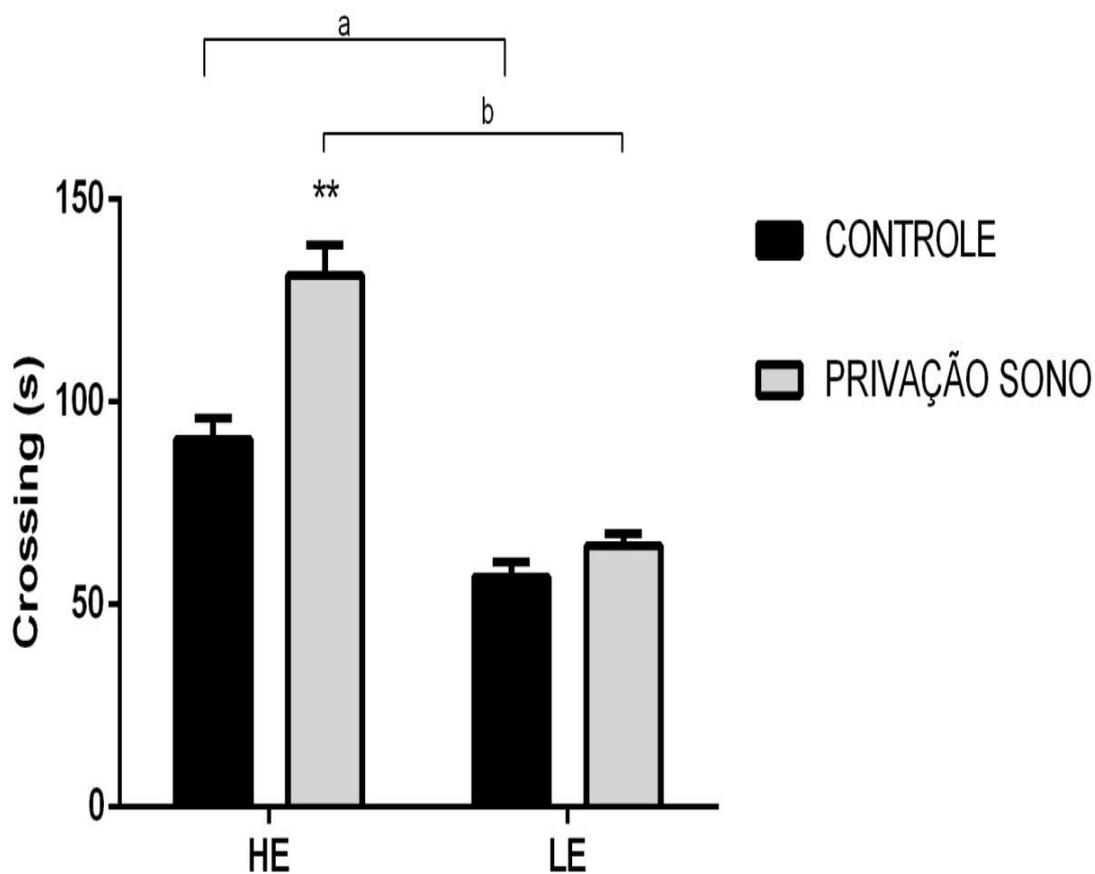
O tempo de imobilidade no teste de campo aberto é importante para analisar os sinais iniciais de comportamentos de depressão (*sickness behaviour*). Como mostrado

na figura 15, os dois extremos de padrão exploratório expostos ou não a privação intermitente do sono paradoxal não alteraram o tempo de imobilidade no campo aberto.

O ANOVA de duas vias apresentou interação significativa entre padrão exploratório e privação do sono paradoxal sobre os parâmetros tempo de permanência no quadrante central [$F(1, 18) = 5,019, P = 0,0379$] e razão do tempo centro/periferia [$F(1, 18) = 5,661, P = 0,0286$], que são utilizados para avaliar atividade ansiolítica no teste do campo aberto como pode ser visto nas figuras 16 e 17.

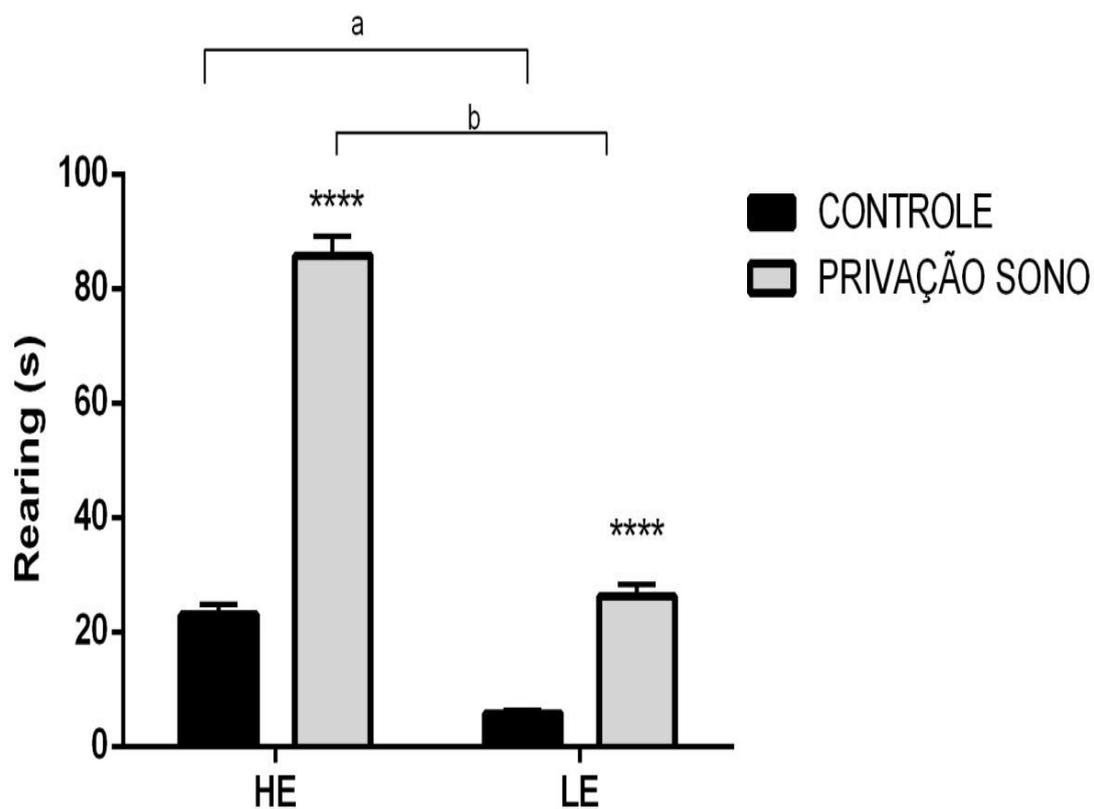
Os animais HE privados do sono paradoxal apresentaram elevação significativa no tempo de permanência no quadrante central da arena ($p < 0,05$), e aumento na razão centro/periferia ($p < 0,05$), quando comparados com os ratos HE não privados. Figs 16 e 17.

Figura 12 – Atividade locomotora no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



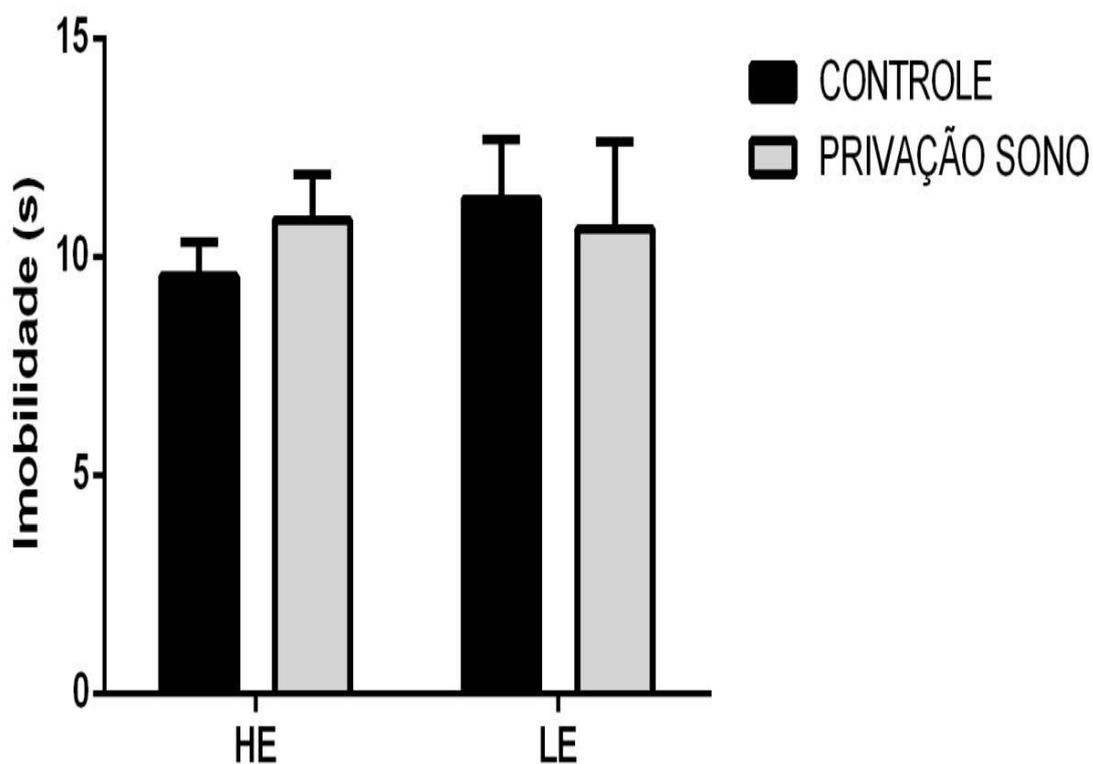
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O número de cruzamentos foi registrado por 10 min no campo aberto. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da frequência de cruzamentos \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA duas vias seguida pelo teste de Tukey. [** $p < 0.001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0.001$ (vs. HE não privado); b $p < 0,0001$ (vs. HE privado). HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 13 – Atividade exploratória no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



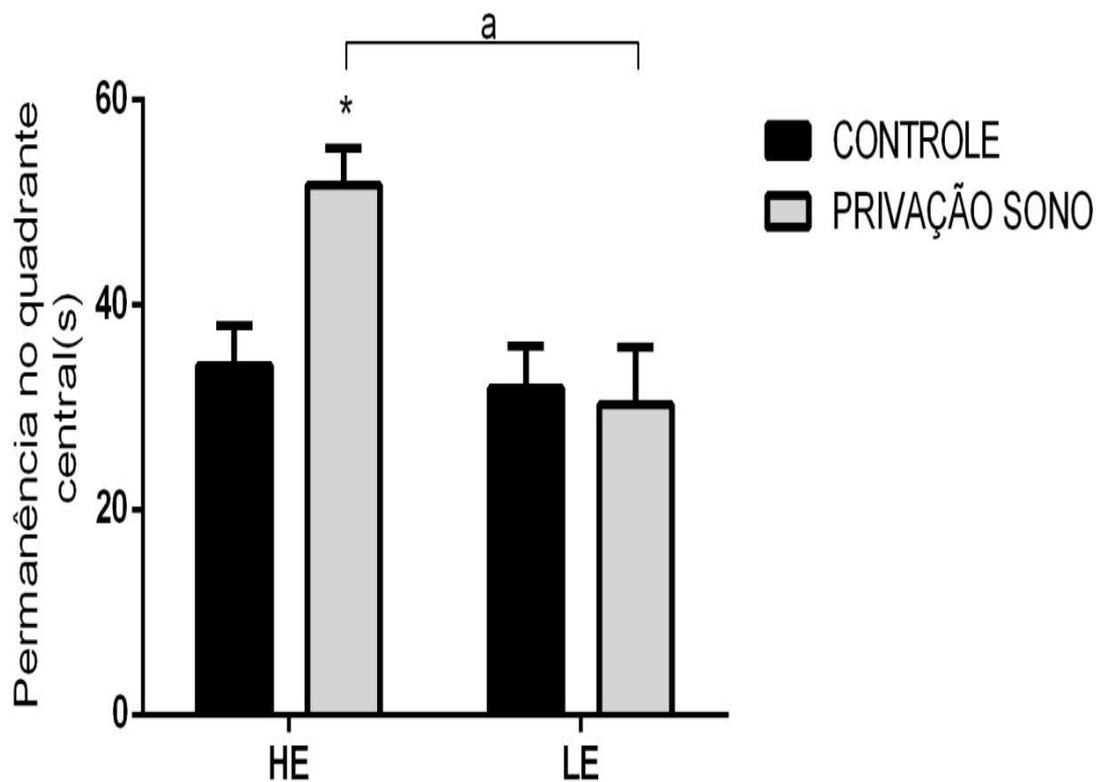
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. A frequência de rearings (n) foi avaliada no teste de campo aberto por 10 min. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da frequência de rearings \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado); ^b $p < 0,0001$ (vs. LE privado do sono)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 14 – Tempo gasto de imobilidade no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



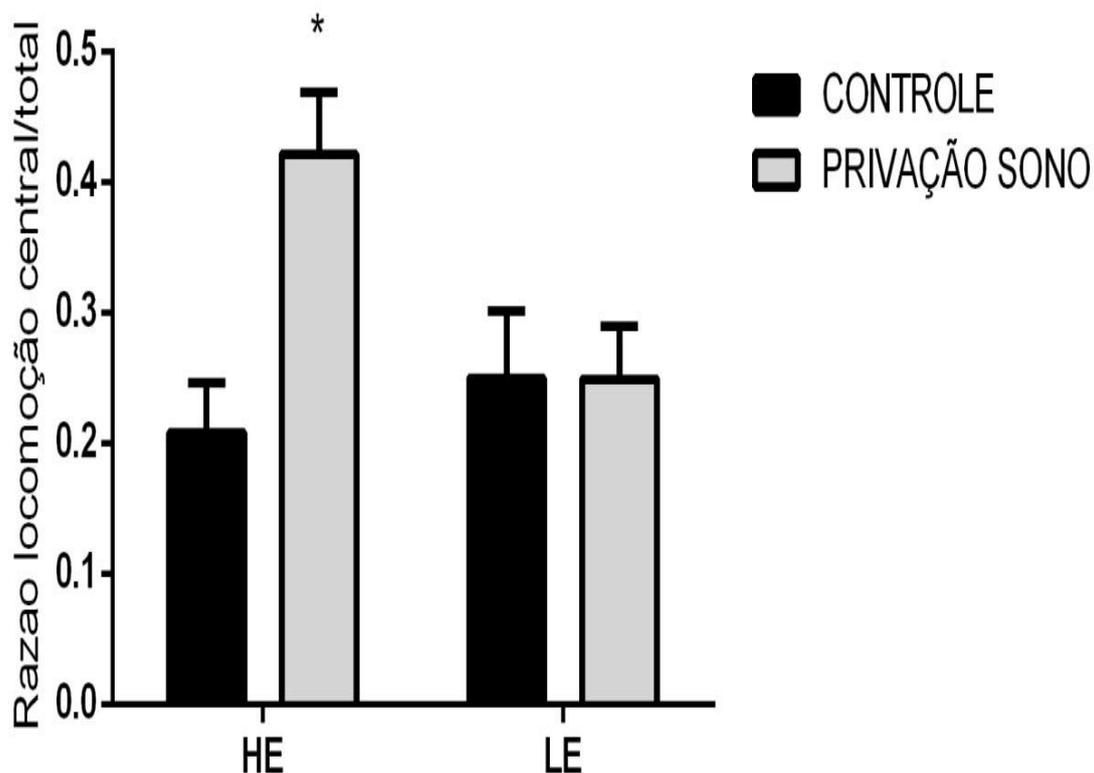
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O tempo de imobilidade (s) foi avaliado por 10 min no campo aberto. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média do tempo de imobilidade \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 15 – Tempo gasto no centro do campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal



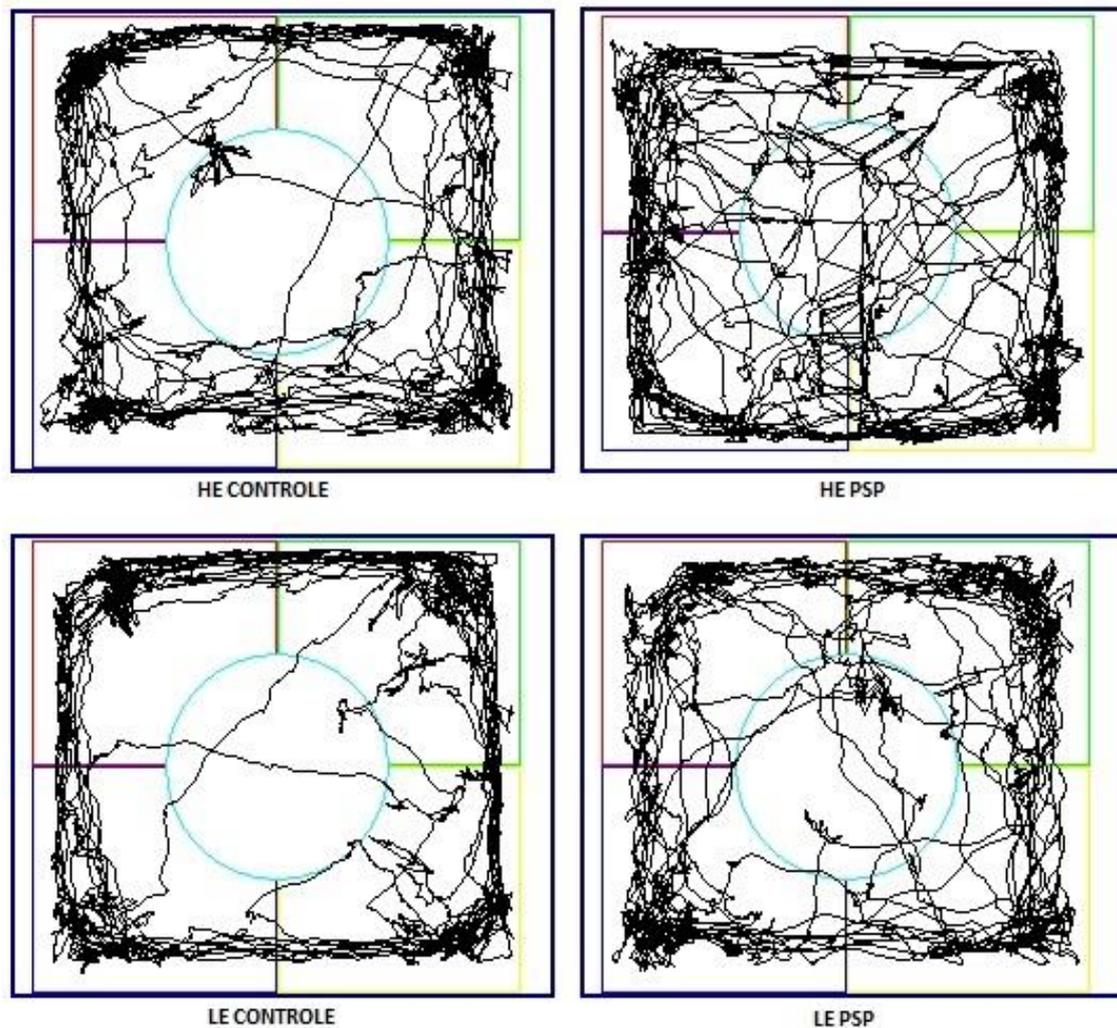
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O tempo de permanência no quadrante central (s) foi registrado por 10 min no campo aberto. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média do tempo de permanência no centro \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [* $p < 0,05$ vs. Controle HE; ^a $p < 0,05$ vs. HE privado de sono]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 16 – Razão do tempo de locomoção central/periferia no campo aberto em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. A razão do tempo locomoção centra/periferia foi avaliada por 10 min no campo aberto. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da razão \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA duas vias seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ vs. Controle HE. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 17 – Mapa do trajeto percorrido pelos animais no teste do campo aberto



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). A presença e o deslocamento do animal foram detectados pelo *software* a partir do seu centro de massa. O trajeto percorrido pelo animal na arena está representado pela linha preta. PSP = privação do sono; HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

2. Comportamento de risco no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

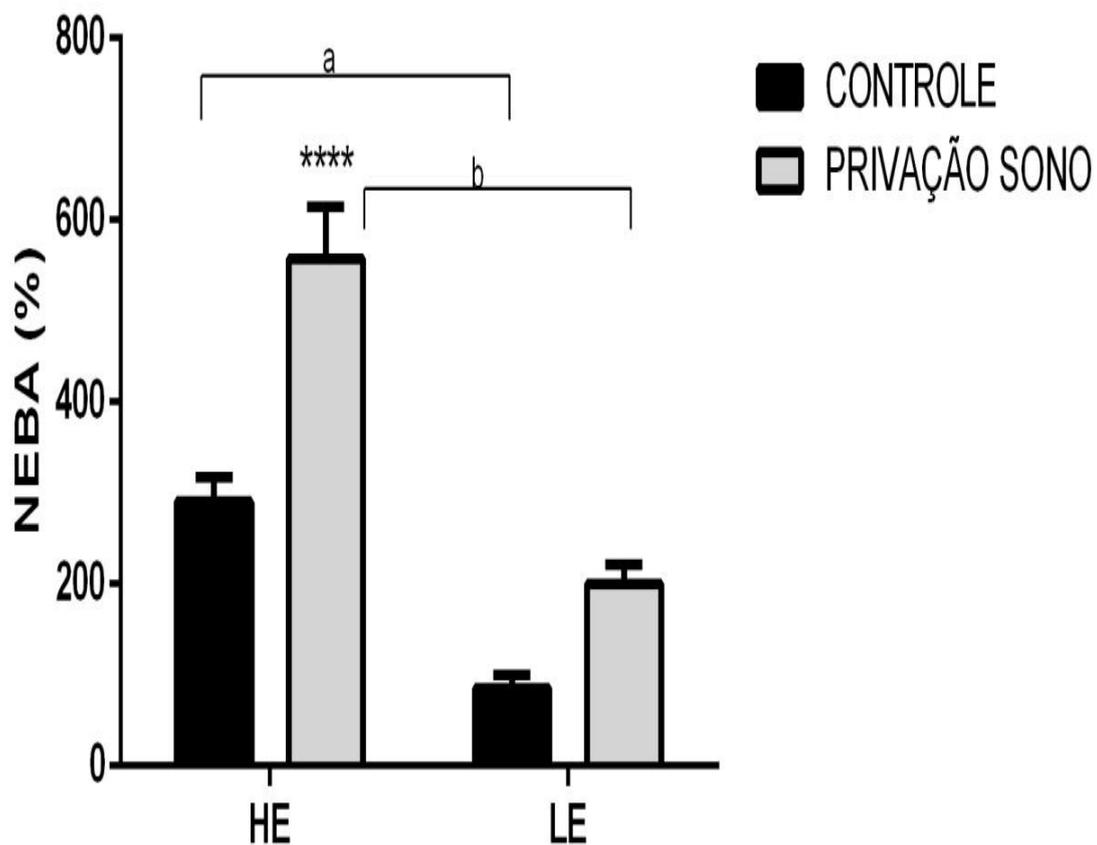
No labirinto em cruz elevado, o fator a ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre os fatores “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” nos parâmetros frequência de entrada nos braços abertos [$F(1, 30) = 8,252, P = 0,0074$] e tempo de permanência nos braços abertos [$F(1, 30) = 10,47, p < P = 0,0030$].

Os ratos HE apresentaram naturalmente um comportamento de risco aumentado, demonstrado pelo aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,001$) e tempo de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$) do que os ratos LE. Figs 19 e 20.

Em alinhamento com esses dados foi verificado que ratos HE privados de sono paradoxal quando comparados aos HE não privados exibiram um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,0001$) e tempo de entradas nos braços abertos ($p < 0,0001$) Figs 19 e 20.

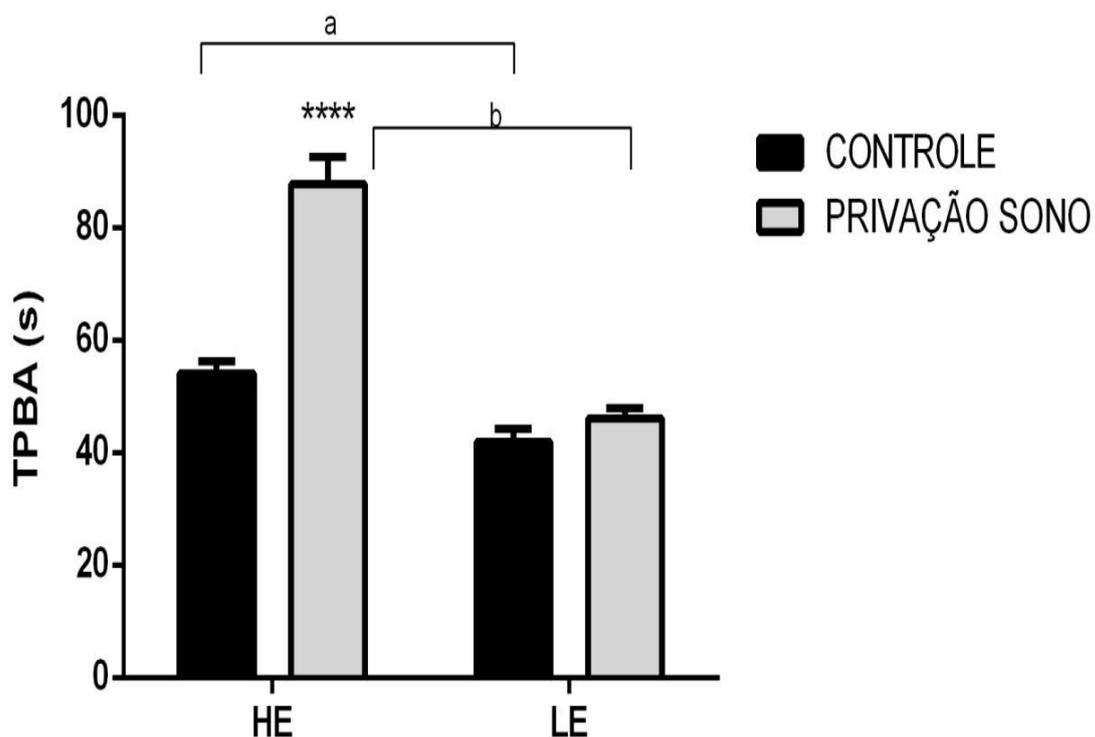
Outro achado interessante foi a manutenção de diferenças significativas no comportamento de risco entre os grupos HE privado de sono paradoxal em comparação com os animais LE privados de sono, haja vista que os animais HE privados de sono paradoxal demonstraram maior porcentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,0001$) e tempo de entradas nos braços abertos ($p < 0,0001$) Figs 19 e 20.

Figura 18 – Percentagem de entrada nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O número de entradas nos braços abertos (n) foi avaliado por 5 min no labirinto em cruz elevado. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da percentagem de entradas nos braços abertos (NEBA) \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0,001$ vs. HE não privado; ^b $p < 0,0001$ vs. HE privado de sono. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 19 – Tempo de permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O tempo de permanência nos braços fechados (s) foi avaliado por 5 min no labirinto em cruz elevado. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média do tempo de permanência nos braços abertos \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0.05$ vs. HE não privado; ^b $p < 0,0001$ vs. HE privado de sono paradoxal. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

4.3 Testes cognitivos

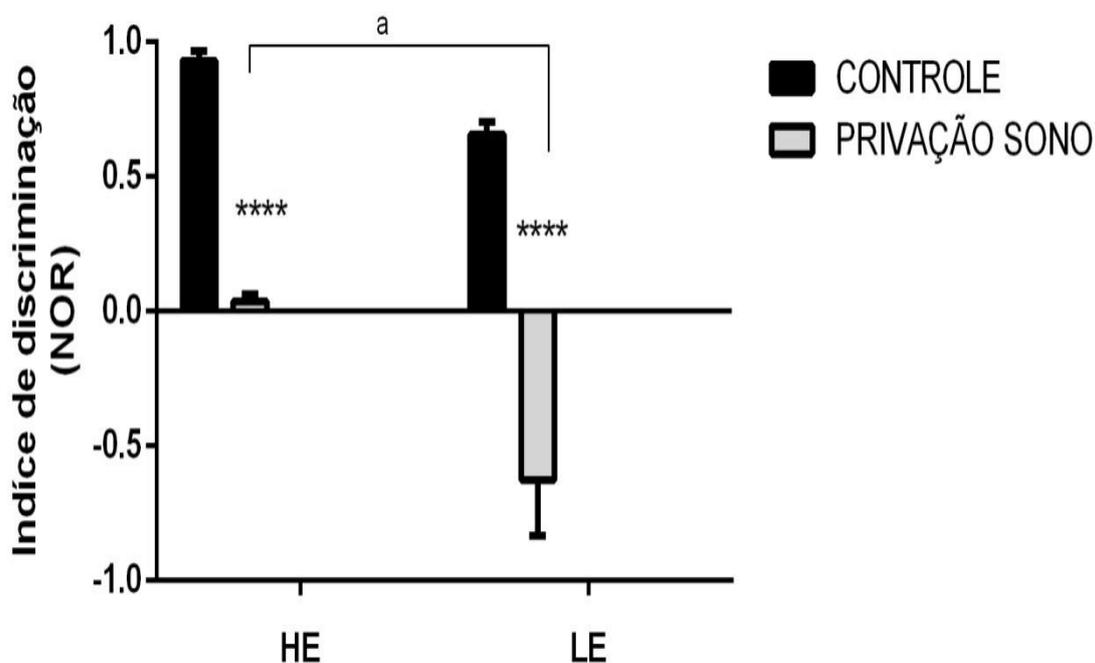
3. Desempenho de animais HE e LE privados e não privados de sono nos testes de reconhecimento do objeto novo (NOR) e labirinto em Y (Ymaze)

Na avaliação cognitiva, ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre os fatores “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” nas medidas de índice de reconhecimento do objeto [$F(1, 19) = 4,190, P = 0,0548$] e percentagem de alterações espontâneas corretas [$F(1, 24) = 6,263, P = 0,0195$].

Os animais HE privados de sono paradoxal apresentaram uma diminuição no índice de reconhecimento do objeto novo quando comparados aos HE não privados ($p < 0,0001$). Da mesma forma os animais LE privados de sono paradoxal apresentaram uma diminuição no índice de reconhecimento do objeto novo quando comparados aos LE não privados ($p < 0,0001$). Além disso, os resultados demonstram diferenças significativas na resposta à privação do sono entre os extremos de padrão exploratório, sendo que os ratos LE privados de sono paradoxal foram mais vulneráveis, com acentuada diminuição no índice de reconhecimento do objeto novo quando comparados aos HE privados de sono paradoxal ($p < 0,0001$) Fig 21.

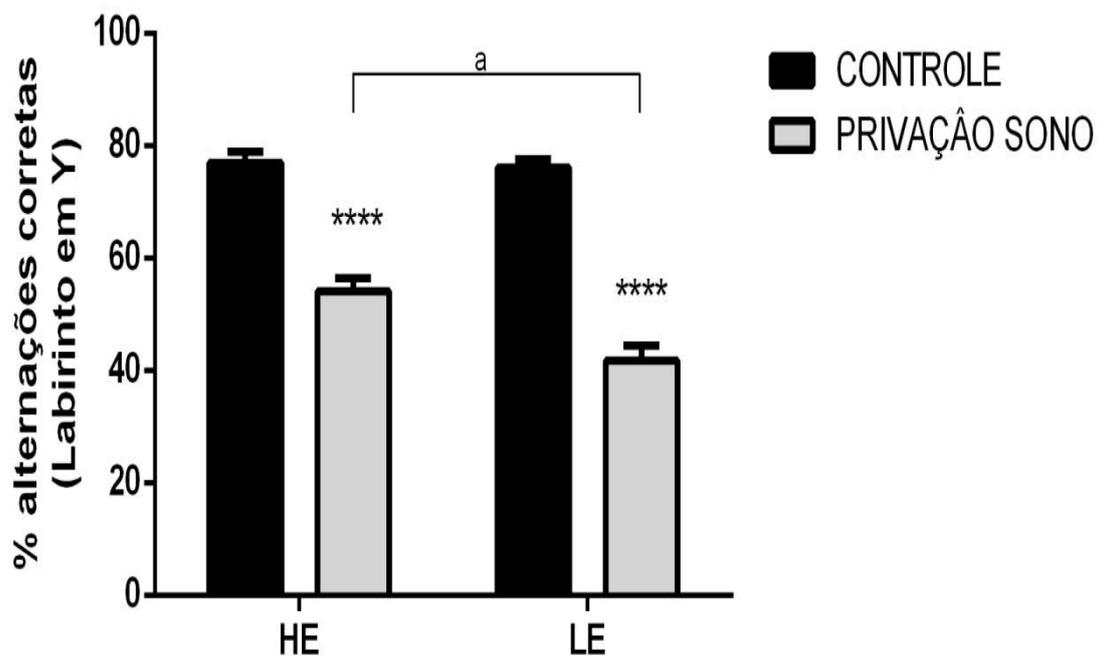
Ocorreu uma diminuição da percentagem de alterações espontâneas corretas no Labirinto em Y em ratos HE privados de sono quando comparados aos HE não privados ($p < 0,0001$). O mesmo ocorreu com os animais LE ($p < 0,0001$). Apesar do déficit de memória no labirinto ter sido demonstrado em ratos HE e LE privados de sono, ele foi significativamente maior no grupo LE privado de sono em comparação com o HE privado do sono ($p < 0,001$). Fig 22.

Figura 20 – Índice de discriminação do objeto novo em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O índice de discriminação do objeto novo foi registrado por 10 min no campo aberto. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média do índice de discriminação do objeto \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; **** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0, 0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 21 – Percentagem de alterações corretas em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. A percentagem de alterações espontâneas corretas (%) foi registrada por 8 min no labirinto em Y. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da frequência de alterações espontâneas ± E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [****p<0.0001 vs. Controle HE; [****p<0.0001 vs. Controle LE; ^ap<0,001 (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

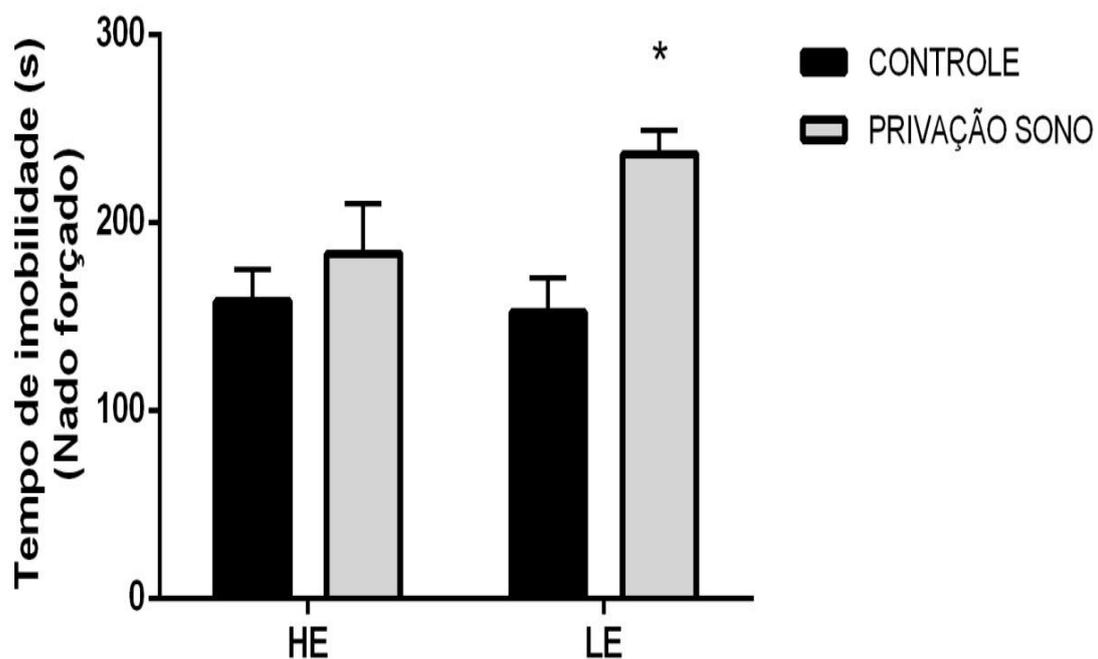
4.4 Testes Depressão

4. Avaliação de comportamentos tipo-depressão através dos testes de imobilidade (Nado forçado) e anedonia (preferência por sacarose) em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) privados ou não de sono paradoxal.

Os animais LE privados de sono quando submetidos ao teste de natação forçada apresentaram aumento significativo do tempo de imobilidade quando comparados aos LE não privados ($p < 0.05$) Fig 23.

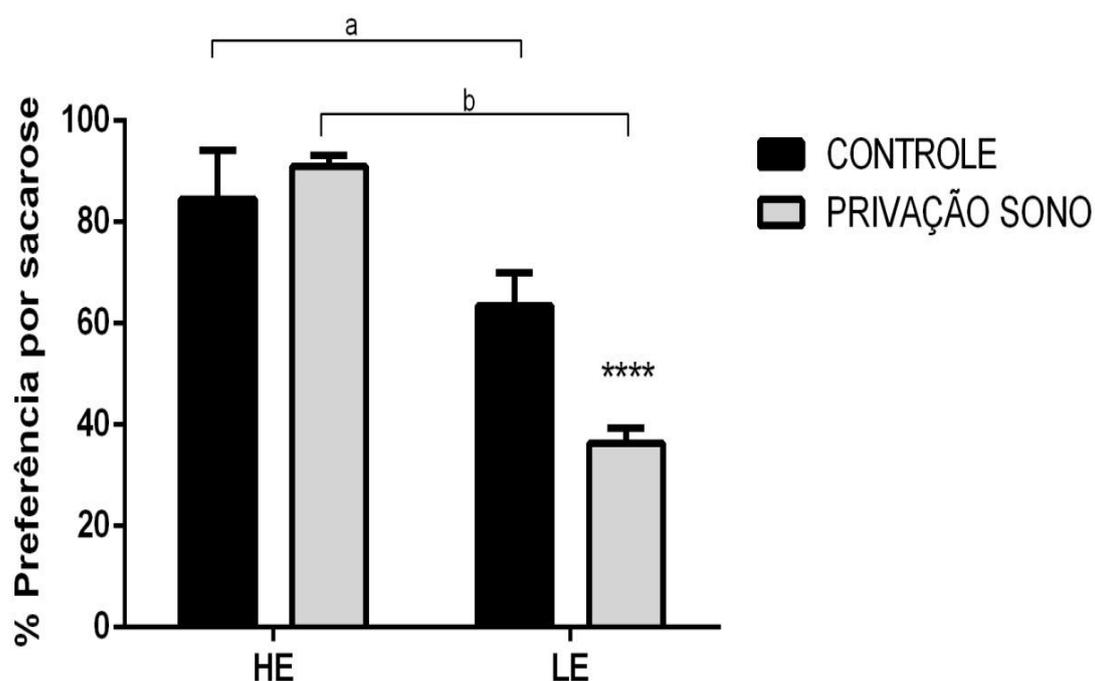
De acordo com ANOVA de duas vias, ocorreu uma interação significativa entre “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” no teste de preferência por sacarose [$F(1, 18) = 37,32; P < 0,0001$]. O teste de Tukey mostrou redução significativa na porcentagem de preferência por sacarose nos animais LE quando comparados ao HE ($p < 0.0001$), apontando maior vulnerabilidade do LE para comportamento de anedonia. Da mesma forma, os animais LE privados de sono reduziram significativamente a preferência por sacarose tanto em relação ao LE não privado ($p < 0.0001$) quanto em relação ao HE privado de sono ($p < 0,0001$) Fig 24.

Figura 22 – Tempo de imobilidade em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. O tempo de imobilidade (s) foi avaliado por 10 min no nado forçado. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média do tempo de imobilidade \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. (* $p < 0.05$ vs. Controle LE). HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 23 – Percentagem de preferência por sacarose em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. A preferência por sacarose (%) foi medida após 1 hora de fase de teste. O teste comportamental foi realizado na idade adulta (PN60). As barras representam a média da percentagem de preferência por sacarose \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE Controle); ^b $p < 0,0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

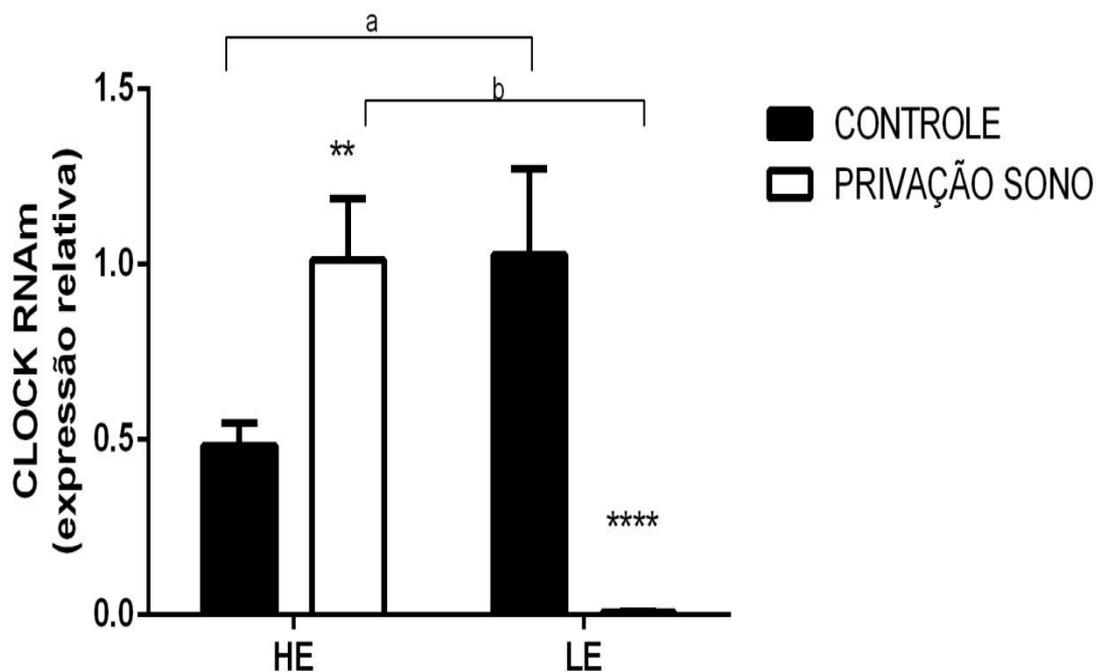
4.5 Efeitos de genofenótipos em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

Na avaliação da expressão gênica de CLOCK, Bmal1, Per 1, Per 2, Per 3 e Cry1 houve aumento igualmente significativo dos níveis basais de RNAm em ratos HE não privados do sono quando comparados aos LE não privados, respectivamente ($p < 0.0001$).

Os animais HE privados de sono paradoxal apresentaram aumento significativamente igual da expressão gênica de CLOCK, Bmal1, Per 1, Per 2, Per 3 e Cry1 quando comparados aos HE não privados, respectivamente ($p < 0.001$). Por outro lado, ratos LE privados de sono diminuíram de forma significativa a expressão dos mesmos genes quando comparados aos LE não privados, respectivamente ($p < 0.0001$).

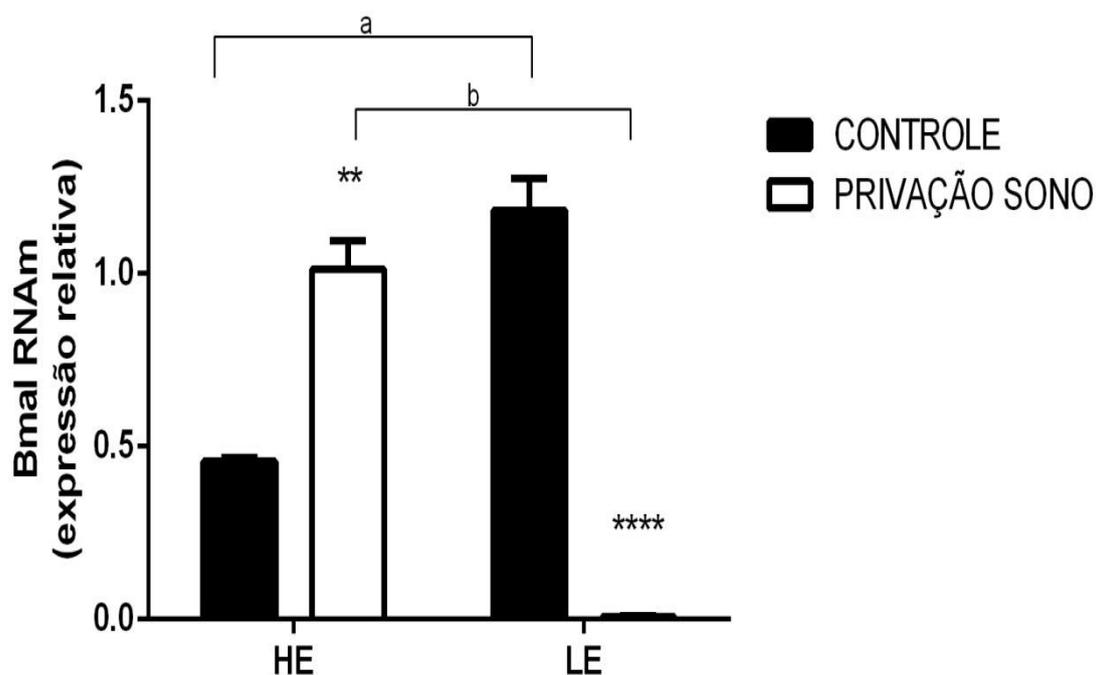
Houve uma diminuição significativa da expressão de RNAm de Cry 2 no grupo HE privado do sono paradoxal quando comparado ao HE não privado ($p < 0.0001$). Da mesma forma que no grupo LE privado do sono paradoxal quando comparado ao LE não privado ($p < 0.0001$).

Figura 24 – Expressão gênica de Clock por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



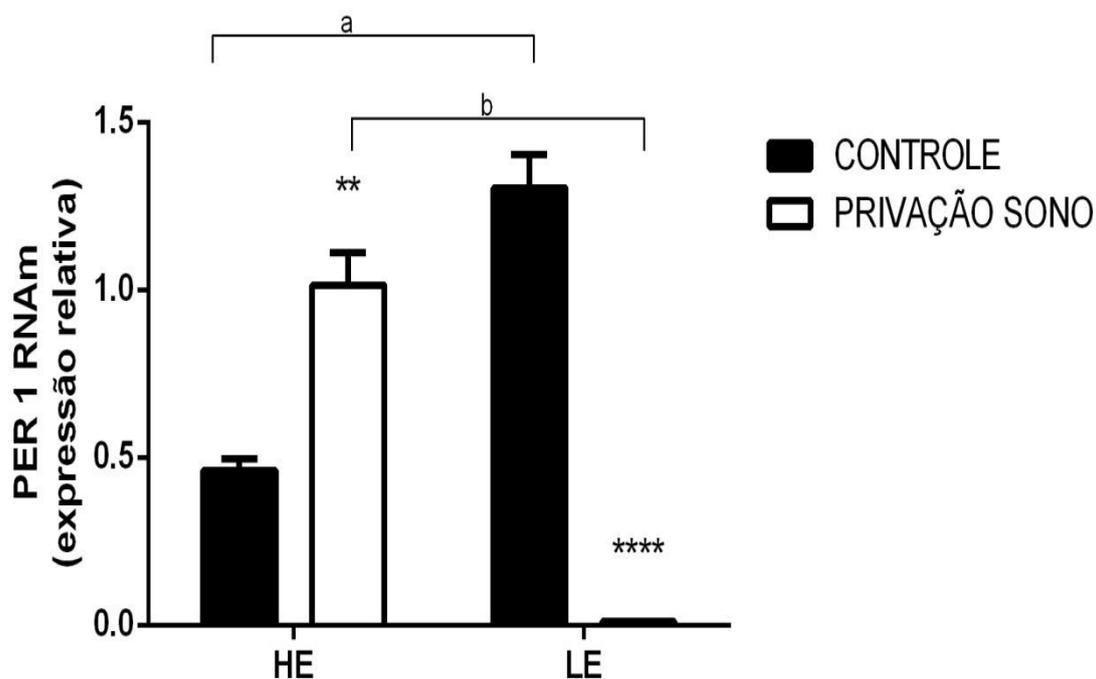
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Clock hipocampais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média ± E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**p<0.001 vs. Controle HE; ****p<0.0001 vs. Controle LE; ^ap<0.0001 (vs. LE não privado do sono); ^bp<0.0001 (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 25 – Expressão gênica de Bmal por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



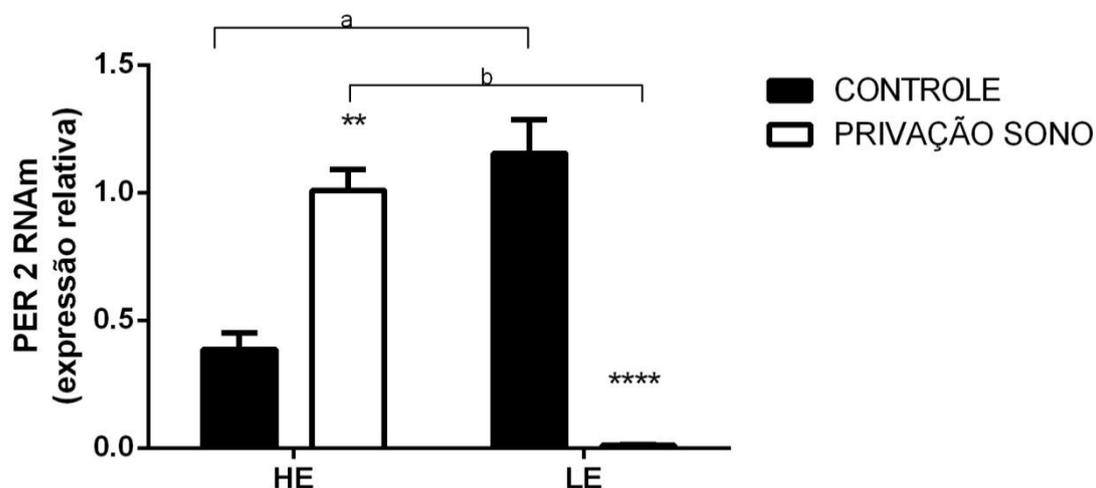
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Bmal 1 hipocampais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [****** $p < 0.001$ vs. Controle HE; ******** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); ^b $p < 0.0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 26 – Expressão gênica de PER1 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



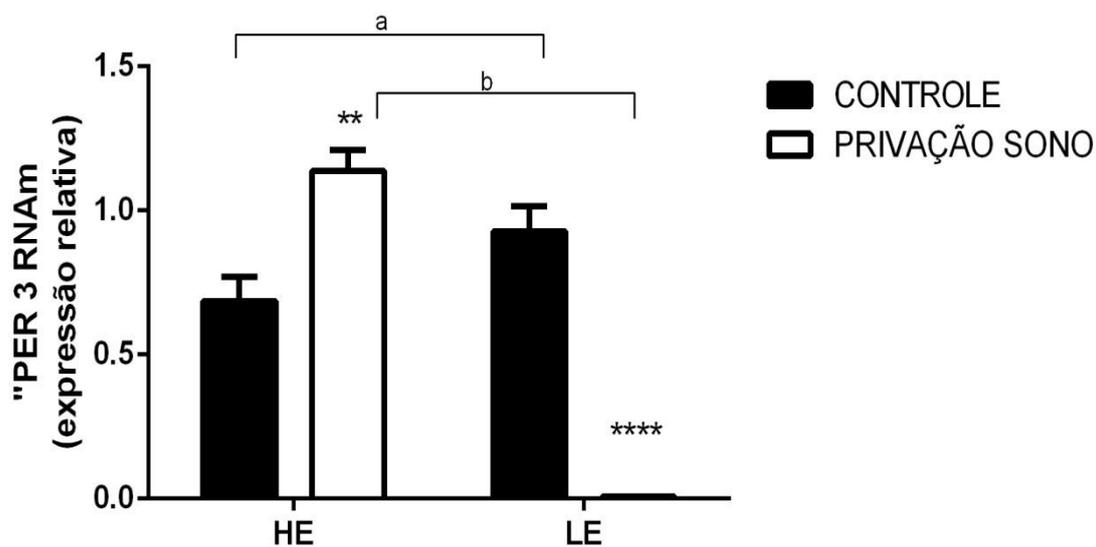
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Per 1 hipocampais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [** $p < 0.001$ vs. Controle HE; **** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); ^b $p < 0.0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 27 – Expressão gênica de PER2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



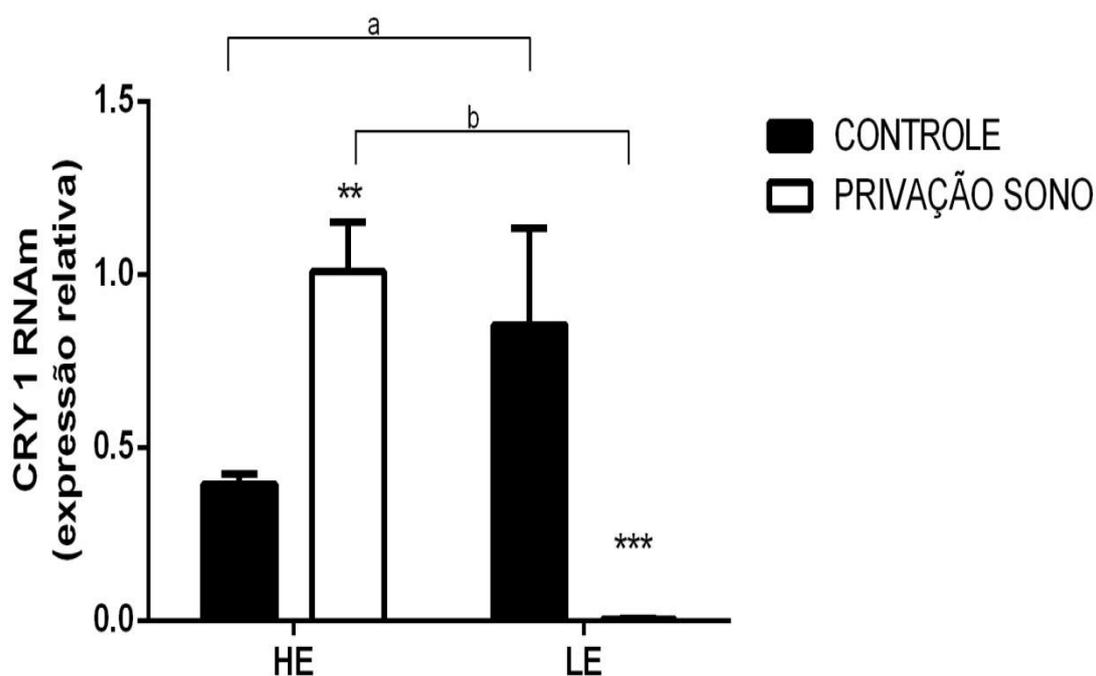
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Per 2 hipocampais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [** $p < 0.001$ vs. Controle HE; **** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); ^b $p < 0.0001$ (vs. LE privado do sono)]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 28 – Expressão gênica de PER3 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



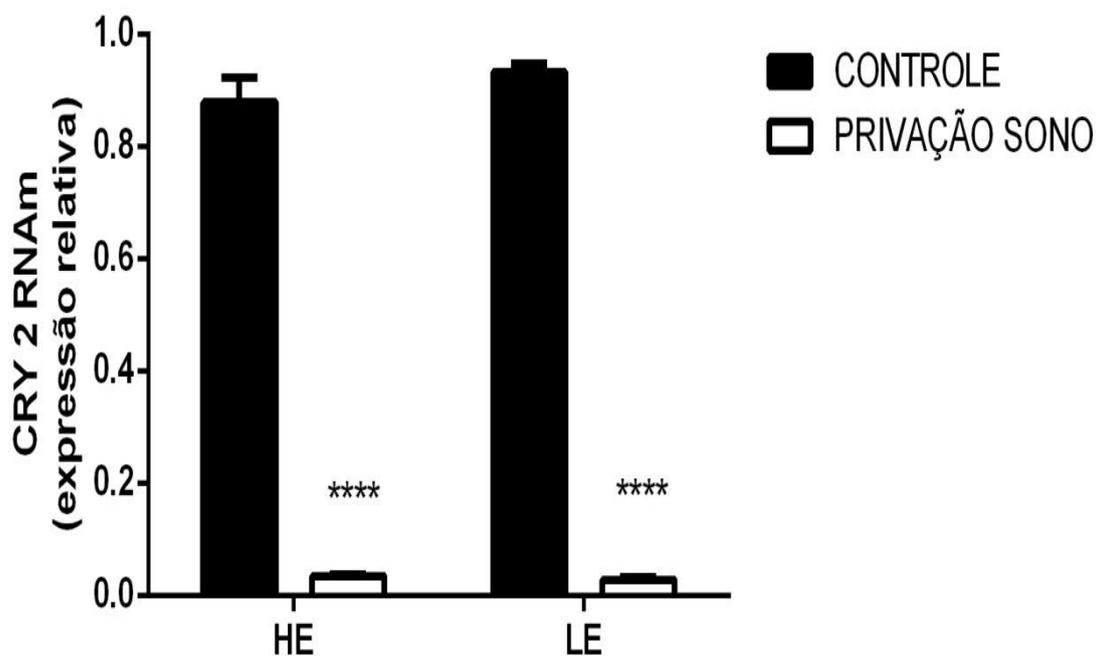
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Per 3 hipocâmpais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [** $p < 0.001$ vs. Controle HE; **** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); ^b $p < 0,0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 29 – Expressão gênica de CRY1 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



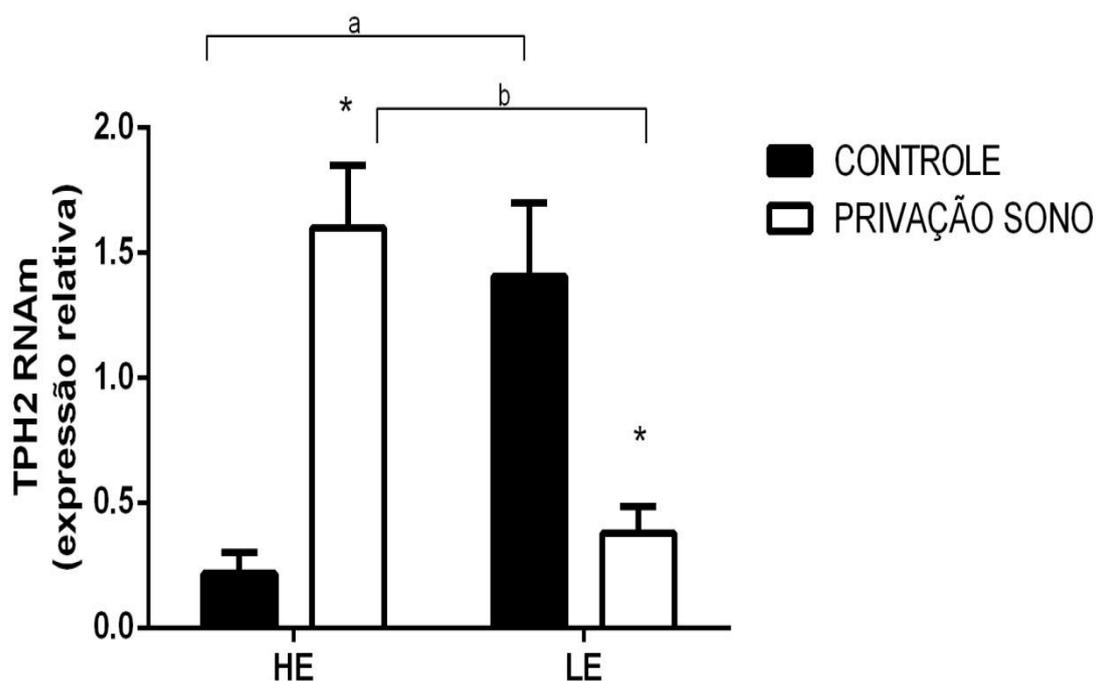
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Cry 1 hipocâmpais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [** $p < 0.001$ vs. Controle HE; *** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); ^b $p < 0,0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 30 – Expressão gênica de CRY2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de Cry 2 hipocampais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média ± E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [****p<0.0001 vs. Controle HE; ****p<0.0001 vs. Controle LE. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 31 – Expressão gênica de TPH2 por qPCR em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

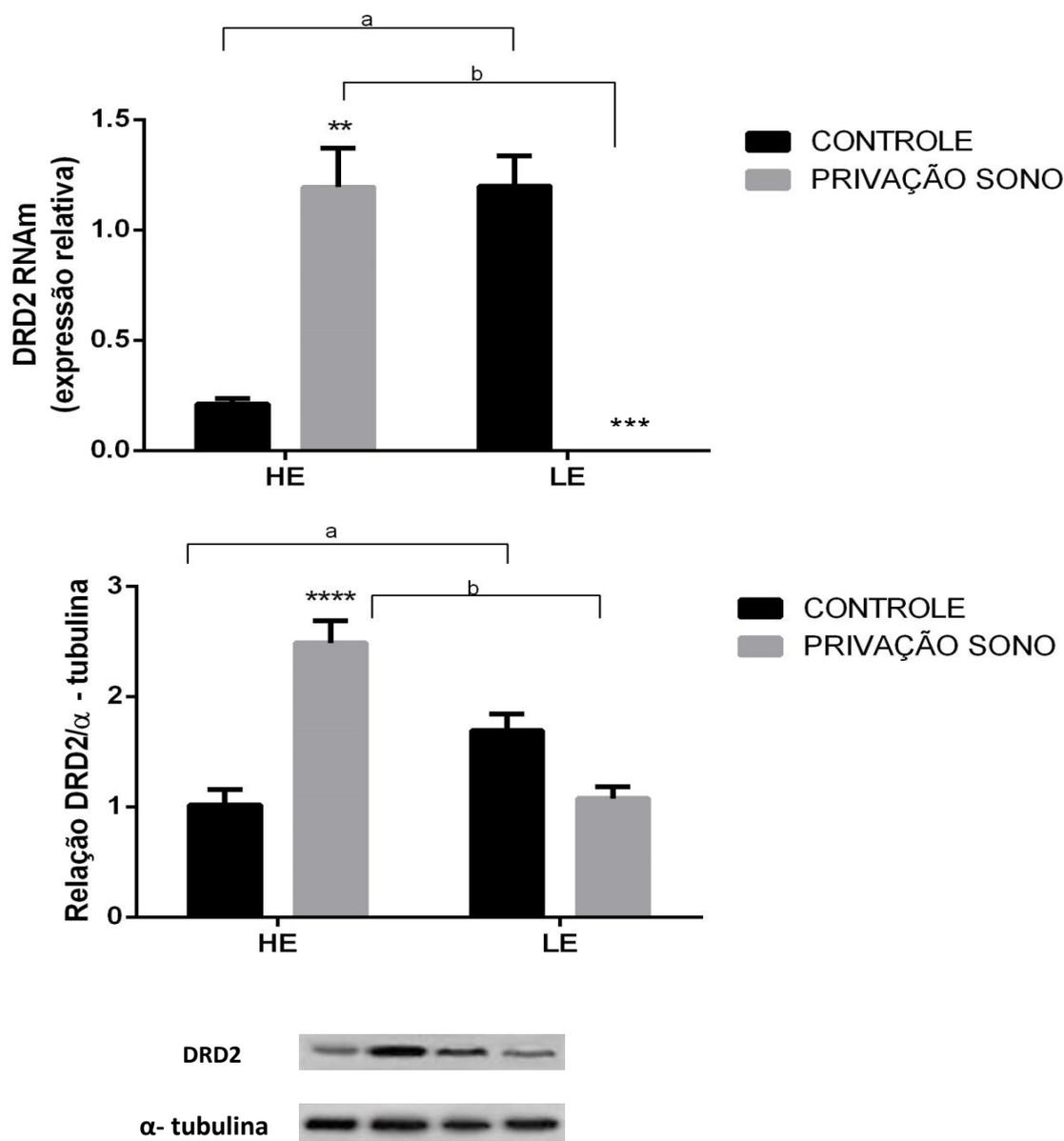


Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Níveis de RNAm de TPH2 hipocâmpais foram mensurados por qPCR na idade adulta (PN60). As barras representam a média ± E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [$*p < 0.001$ vs. Controle HE; $*p < 0.001$ vs. Controle LE; $^ap < 0.0001$ (vs. LE não privado do sono); $^bp < 0,0001$ (vs. LE privado do sono)]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

4.6 Avaliação do receptor de dopamina D2 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias, foi encontrada interação entre “padrão exploratório” e “privação do sono” quanto à expressão gênica de DRD2 [$F(1, 9) = 68,88; P < 0,0001$] e expressão proteica de DRD2 [$F(1, 14) = 45,06, P < 0,0001$], sendo que o pós-teste de comparações múltiplas revelou diferenças basais nos níveis de expressão gênica entre os grupos com um aumento significativo no grupo LE quando comparado ao grupo HE ($P < 0,001$). Apesar do grupo LE privado de sono paradoxal partir de um ponto de expressão gênica basal aumentada, quando exposto ao estresse de privação do sono paradoxal ele responde diminuindo de forma significativa a expressão gênica do receptor DRD2 (LE privado de sono vs. LE, $p < 0,0001$). Em lado oposto, o grupo HE privado do sono paradoxal que parte de níveis basais de expressão gênica reduzida, quando expostos à privação do sono aumentam consideravelmente os níveis de RNAm do receptor DRD2 (HE PSP vs. HE, $p < 0,001$). Fig 33.

Figura 32 – Expressão gênica por qPCR e protéica por imunoblotting hipocampal do receptor DRD2 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Expressão gênica e proteica do receptor de D2 por qPCR e por imunoblotting na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA duas vias seguida pelo teste de Tukey. DRD2 RNA m: [****** $p < 0.001$ vs. Controle HE; ******* $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0.001$ (vs. LE não privado); ^b $p < 0.0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]; DRD2 proteína: ******** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0.05$ (vs. LE não privado); ^b $p < 0.0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

4.7 Determinação do estresse oxidativo

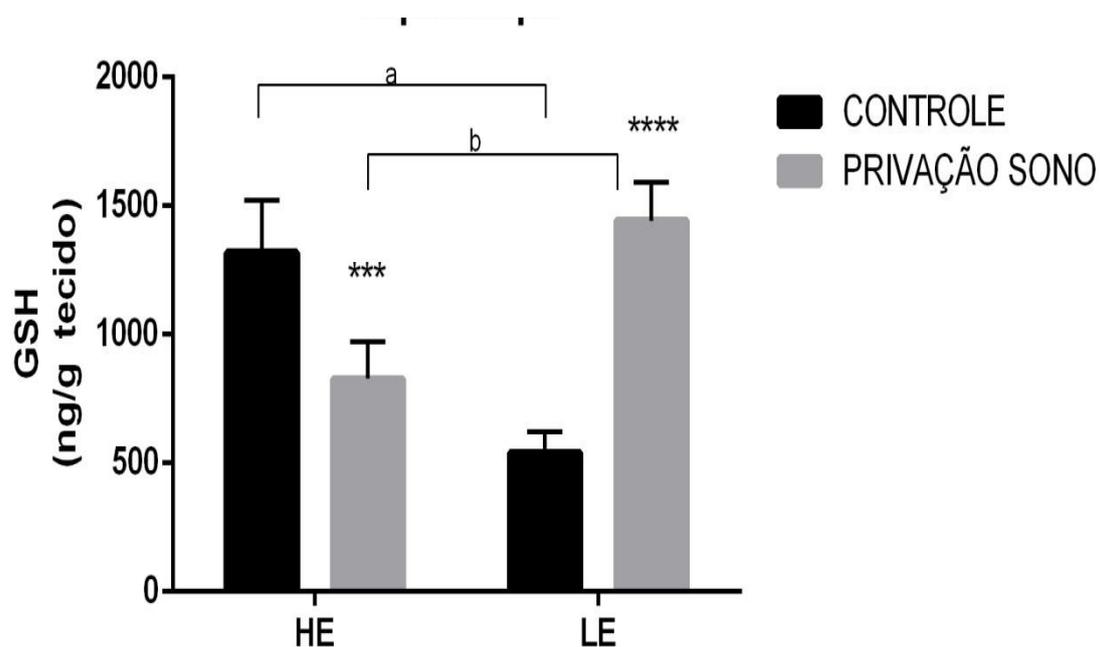
5. Níveis de GSH e MDA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

De acordo com a ANOVA de duas vias foi detectada interação significativa entre “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre os níveis de GSH [F(1, 19) = 130,4, P < 0,0001].

Em relação aos níveis de GSH, houve diferenças significativas nos níveis basais desse antioxidante fisiológico entre os grupos HE e LE ($p < 0.0001$) sugerindo que os animais LE têm níveis basais de GSH inferiores ao grupo HE. Por outro lado, embora o grupo HE tenha níveis basais maiores de GSH, o grupo HE PSP quando foi exposto à privação demonstrou maior vulnerabilidade por redução significativa nos níveis de GSH ($p < 0.0001$ vs. HE) e aumento nos níveis de MDA, como citado anteriormente. Em posição oposta os níveis fisiológicos de antioxidantes em animais LE apresentaram-se reduzidos sem nenhuma exposição à contigência ambiental, entretanto quando exposto o grupo LE PSP vs. LE aumentou de forma significativa os níveis de GSH ($p < 0.0001$), sugerindo um mecanismo de homeostase de combate a peroxidação lipídica. Fig 34.

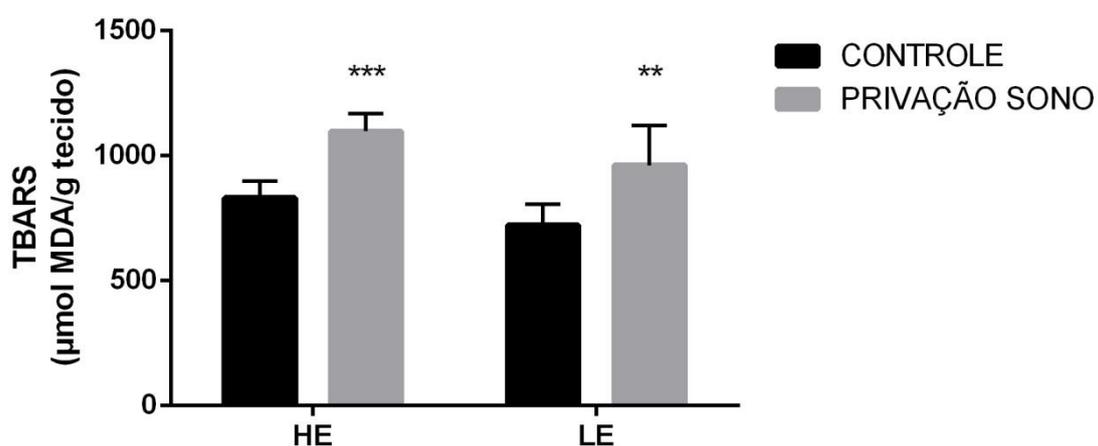
O pós-teste de comparações múltiplas revelou não existir diferenças estatísticas nos níveis basais de MDA entre os grupos HE e LE. Por outro lado, foram encontradas diferenças entre os grupos HE e LE quando expostos à privação do sono paradoxal. O grupo HE privado do sono paradoxal aumentou os níveis de MDA de forma significativa ($p < 0.0001$ vs. HE). Já o grupo LE privado do sono elevou de forma estatisticamente significativa os níveis desse marcador de peroxidação lipídica ($p < 0.001$ vs. LE). Fig 35

Figura 33 – Níveis de GSH em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de GSH hipocâmpais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média dos níveis de GSH \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** p <0.0001 vs. Controle HE; [**** p <0.0001 vs. Controle LE; ^a p <0.0001 (vs. LE Controle); ^b p <0.0001 (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 34 – Níveis de MDA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



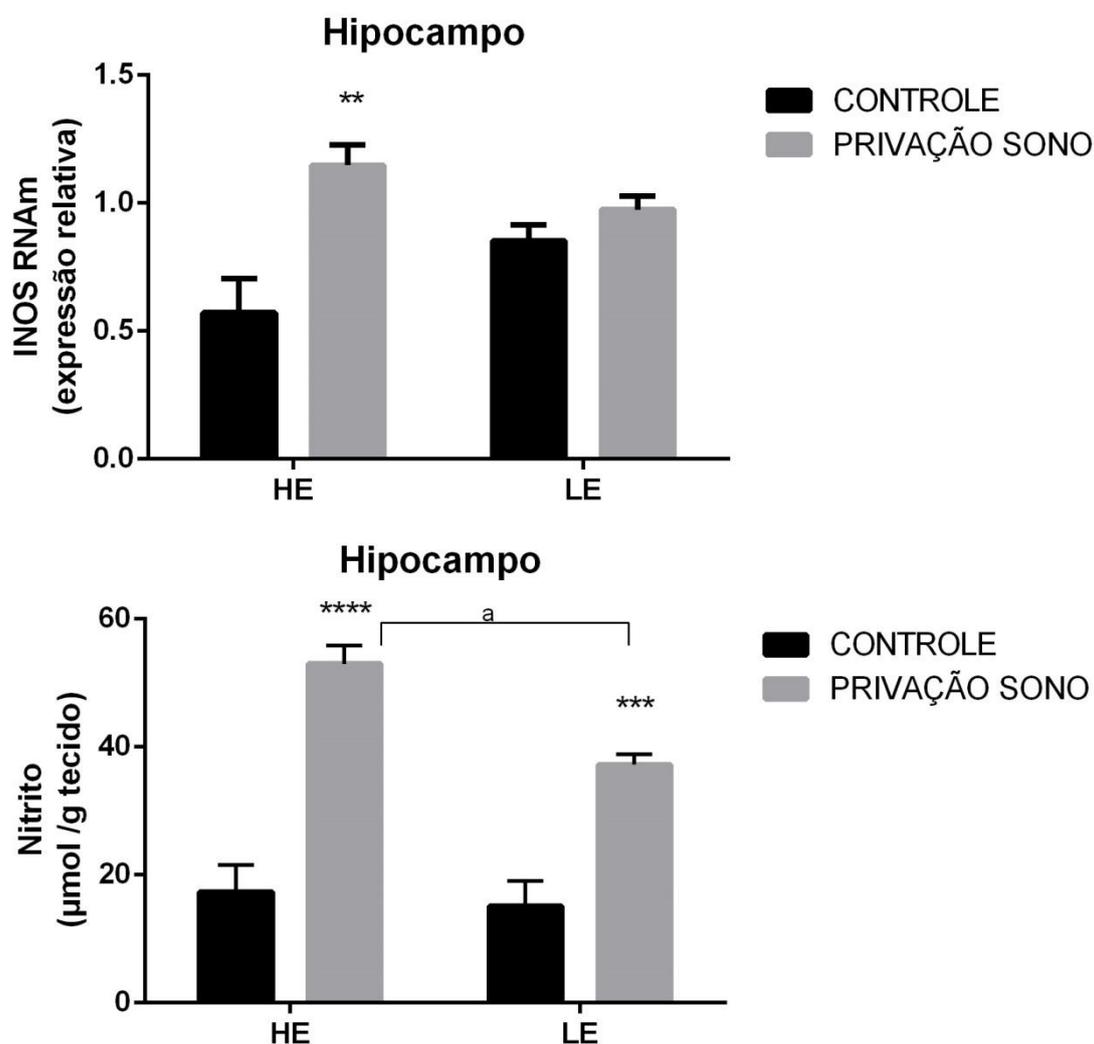
Ratos HE e LE foram selecionados privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias 10 dias na adolescência. Os níveis de MDA hipocampais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média dos níveis de MDA \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [*** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ** $p < 0.001$ vs. Controle LE]. CONTROLE = Salina; PSP = privação do sono; HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

4.8 Avaliação da resposta inflamatória

No presente estudo a análise de dados por ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da associação entre “padrão exploratório” e “privação do sono paradoxal” sobre a expressão gênica de iNOS no hipocampo [F (1, 10) = 7,394] e níveis de nitrito no hipocampo [F (1, 22) = 4,733, P = 0,0406].

Os dados post hoc apontam conforme apresentado na figura 41 que não há diferenças estatísticas na expressão gênica de INOS e níveis de nitrito entre os grupos HE e LE, sugerindo um ponto de partida similar na síntese destes marcadores inflamatórios. Por outro lado, quando os diferentes temperamentos são expostos à privação do sono paradoxal há o aumento significativo da expressão gênica de iNOS no grupo HE PSP vs. HE ($p < 0.001$) e da mesma forma o aumento dos níveis de nitrito tanto no HE PSP vs. HE ($p < 0.0001$) quanto no LE PSP vs. LE ($p < 0.001$). Esses dados demonstram que a privação do sono paradoxal elevou a expressão gênica de iNOS, e sugerimos, apesar de não termos quantificado a proteína, que provavelmente também houve aumento da expressão protéica da iNOS e que foi acompanhada por aumento dos níveis de NO, evidenciados indiretamente por elevada concentração de nitrito tanto em animais HE PSP quanto LE PSP expostos à privação do sono paradoxal. Ainda sobre o aumento dos níveis do metabólito do NO em ambos os temperamentos submetidos à privação do sono evidenciamos sobre esse aumento que ele foi significativamente maior no grupo HE PSP vs. LE PSP ($p < 0.001$), reforçando as diferenças de respostas inflamatórias entre ratos HE e LE privados do sono paradoxal. Fig 36.

Figura 35 – Efeitos na expressão gênica de iNOS por qPCR e níveis de nitrito por ELISA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. A expressão gênica hipocampal de *iNOS* por qPCR e níveis de nitrito por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [iNOS RNAm ** $p < 0.001$ vs. Controle HE; Nitrito **** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; *** $p < 0.0001$ vs. Controle LE; ^a $p < 0,001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

4.9 Efeitos em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal nos níveis de interleucinas cerebrais.

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 podem ser secretadas por muitos tipos de células como macrófagos e monócitos e tem importante função na patogênese das dos distúrbios psiquiátricos.

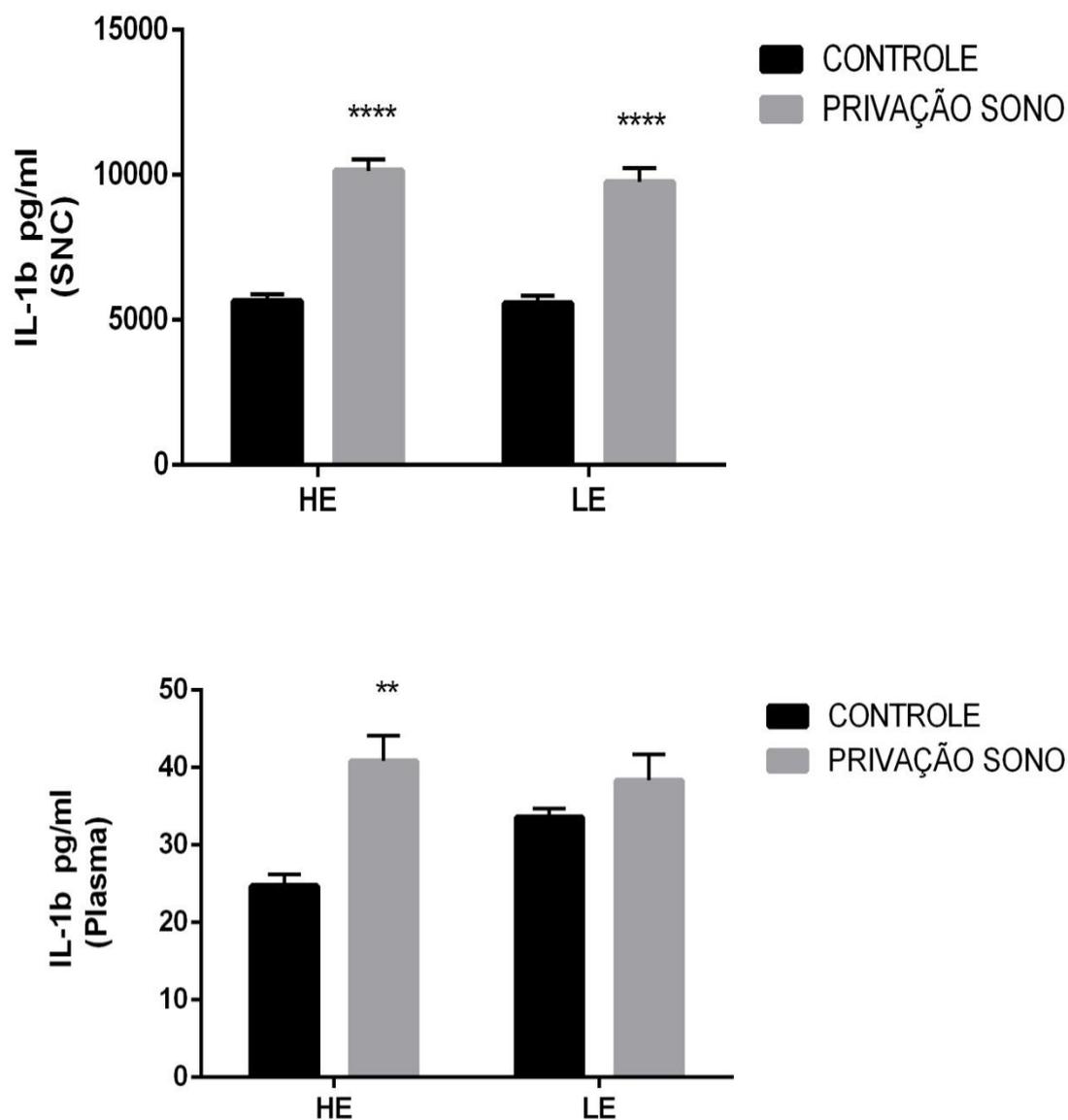
Não houve diferenças significativas nos níveis fisiológicos das interleucinas pró-inflamatórias entre ratos HE e LE. Entretanto, uma vez que os distintos “padrões exploratórios” foram expostos à privação do sono houve um aumento similar de IL-1 β em ratos HE privados do sono comparados aos ratos HE não privados do sono ($p < 0,0001$) e da mesma forma entre ratos LE privados do sono comparados aos LE não privados do sono ($p < 0,0001$). Já a interleucina IL-1 β plasmática aumentou significativamente no grupo HE privado do sono comparado ao HE não privado ($p < 0,001$) correlacionando-se com o também aumento dos níveis da interleucina tecidual neste mesmo grupo. Fig 37.

Os níveis de IL-6 tecidual e plasmática em animais HE não privados e HE privados do sono não foram alterados. Por outro lado a IL-6 tecidual aumentou em ratos LE privados do sono em comparação com LE não privados ($p < 0,05$), mas este aumento não se correlacionou com os níveis plasmáticos Fig.38.

A citocina imunomoduladora IL-4 tecidual aumentou de forma significativa em animais HE privados do sono comparados aos HE não privados ($p < 0,001$) e da mesma forma houve aumento no grupo LE privados do sono comparados aos LE não privados ($p < 0,001$). Ainda houve correlação significativa no aumento da IL-4 plasmática no grupo HE privado do sono em comparação ao grupo HE não privado ($p < 0,0001$) Fig. 39

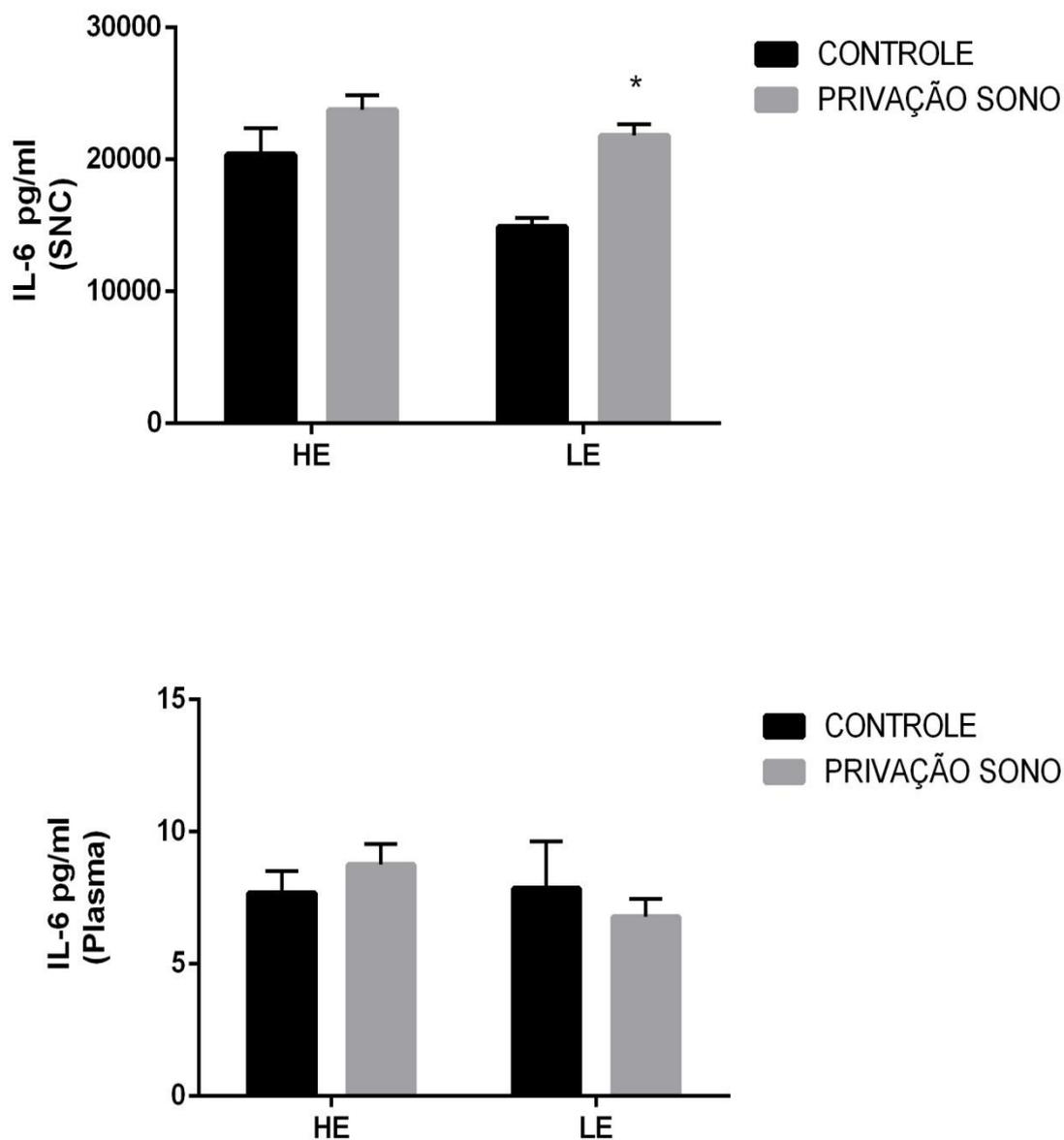
A avaliação das citocinas plasmáticas produziu resultados interessantes em relação ao fenótipo HE. Uma vez que os níveis plasmáticos das interleucinas pró-inflamatórias foram similares aos níveis teciduais.

Figura 36 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-1 β em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal



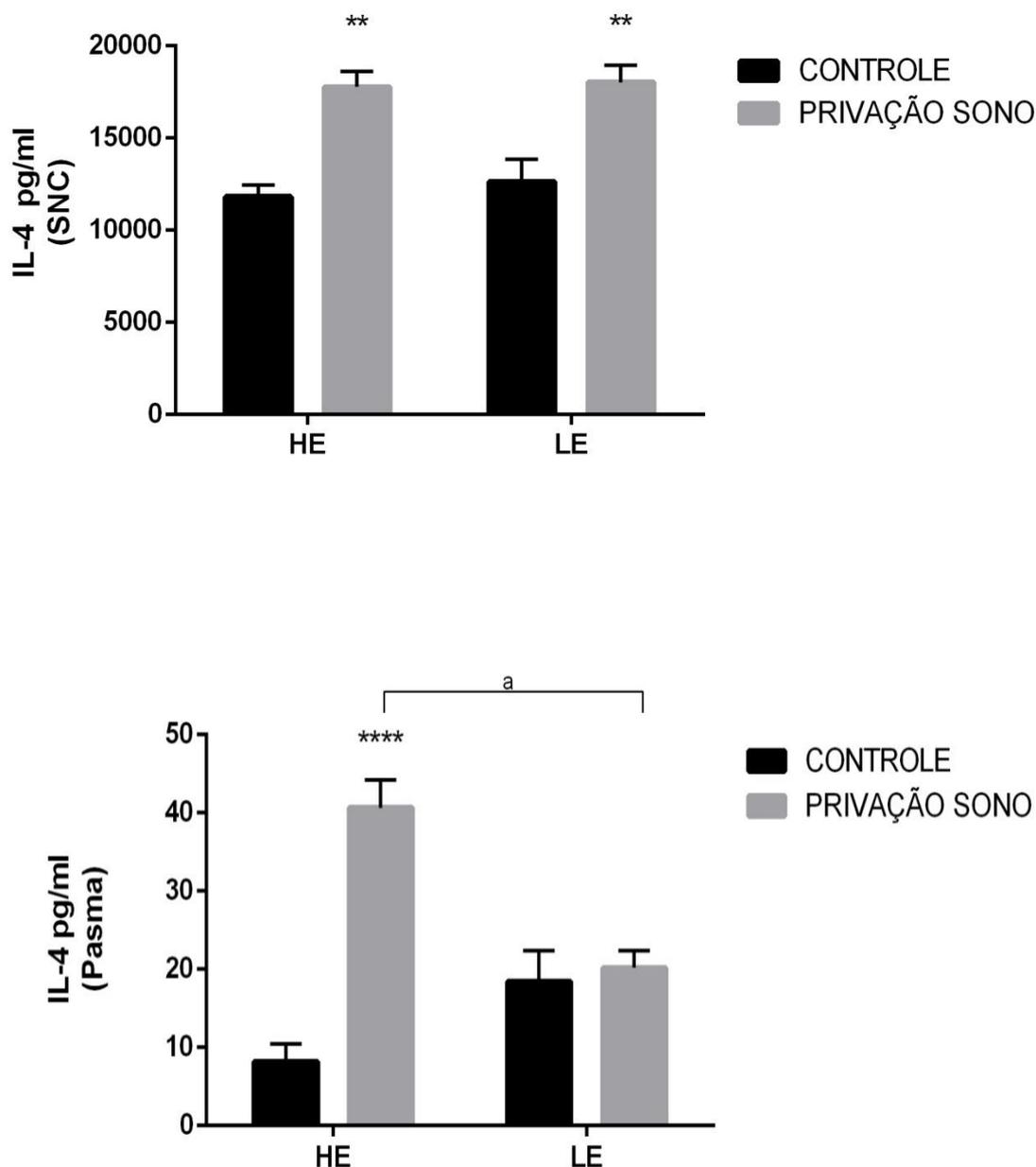
Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de IL-1 β hipocámpais e plasmáticos foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [SNC ****p<0.0001 vs. Controle HE; ****p<0.0001 vs. Controle LE; Plasma **p<0.001 vs. Controle HE]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

Figura 37 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-6 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de IL-6 hipocámpais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. SNC (* $p < 0.05$ vs. Controle LE). HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

Figura 38 – Níveis teciduais e plasmáticos de IL-4 em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

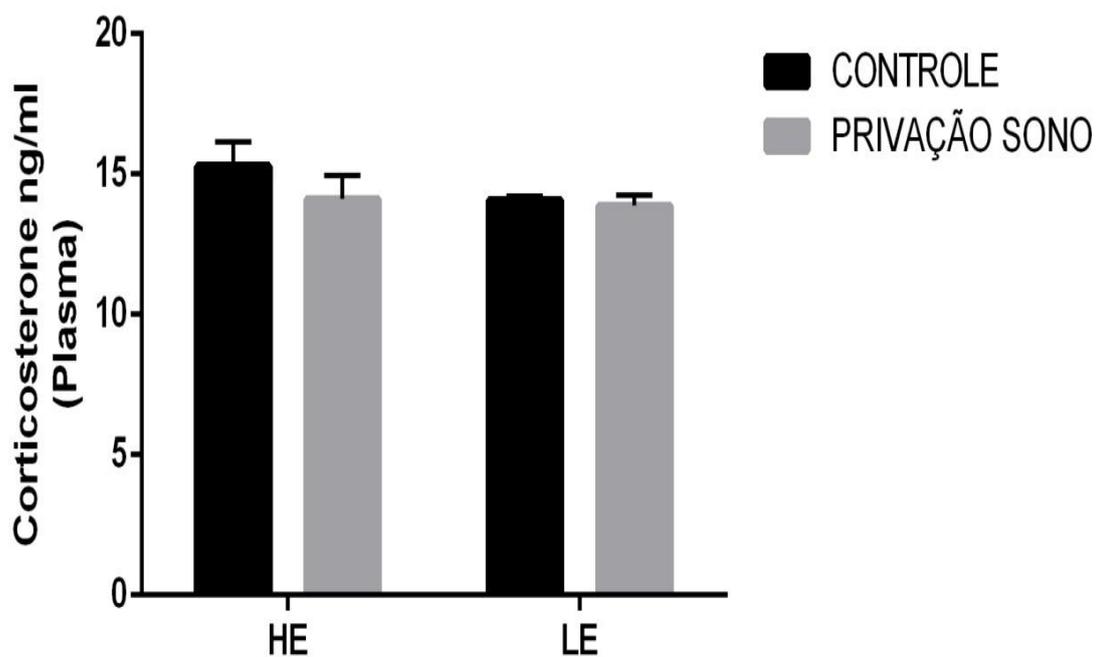


Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de IL-4 hipocámpais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [Hipocampo** $p < 0.001$ vs. Controle HE; ** $p < 0.001$ vs. Controle LE; Plasmático: **** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ^a $p < 0,0001$ (vs. LE privado do sono paradoxal)]. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

4.10 Efeitos no eixo HPA em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

Os resultados deste experimento mostraram que os animais com extremos de padrões exploratórios expostos à contingência ambiental privação do sono paradoxal na fase de puberdade não apresentaram alterações nos níveis séricos de corticosterona na idade adulta, uma vez que os níveis do hormônio não diferiram entre si. Entretanto, uma limitação desta dosagem foi que os animais não foram expostos a um agente estressor que ativasse o eixo HPA antes da coleta de sangue. Fig 40.

Figura 39 – Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

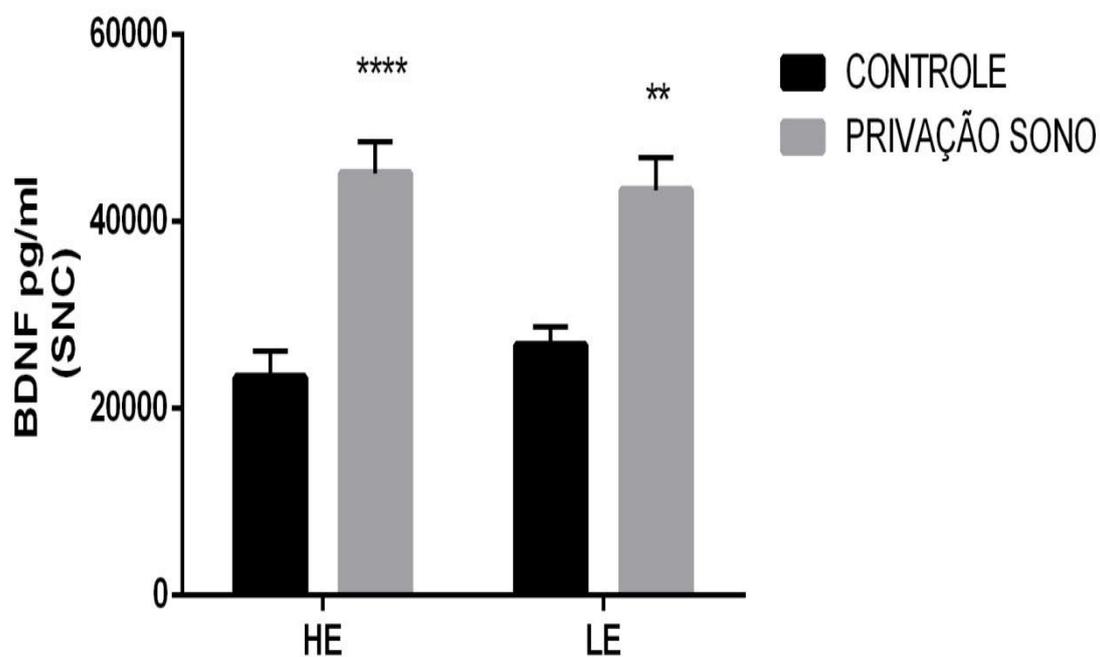


Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de corticosterona hipocampais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. HE = alto exploratório; LE= baixo exploratório.

4.11 Níveis de neurotrofina hipocampais em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.

Os níveis basais do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram similares nos grupos HE e LE, entretanto após a privação do sono paradoxal os níveis da neurotrofina aumentaram significativamente nos grupos HE privados do sono comparados ao HE não privados ($p < 0,0001$). Da mesma forma houve aumento significativo no grupo LE privado do sono comparado ao LE não privado ($p < 0,001$). Fig 41.

Figura 40 – Níveis de BDNF em ratos alto exploratórios (HE) e baixo exploratórios (LE) submetidos ao modelo de privação do sono paradoxal.



Ratos HE e LE foram selecionados e privados do sono paradoxal por 24 h intermitentes com repouso durante 10 dias na adolescência. Os níveis de BDNF hipocámpais foram mensurados por ELISA na idade adulta (PN60). As barras representam a média \pm E.P.M. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. [**** $p < 0.0001$ vs. Controle HE; ** $p < 0.001$ vs. Controle LE]. HE = alto exploratório; LE = baixo exploratório.

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que as diferenças comportamentais individuais, aqui chamadas padrões exploratórios podem ser caracterizadas em ratos. Fazendo uma translação para o ser humano estes padrões exploratórios refletem características temperamentais que influenciam uma variedade de comportamentos e parâmetros neuroquímicos e genéticos em resposta ao meio ambiente. Vale destacar que o método usado para separar os extremos de padrão exploratório e, portanto, temperamento foi relativamente estável ao longo do tempo, tal como esperado para características de traços de temperamento em humanos.

Nossos dados sugerem diferenças entre ratos HE e LE em comportamentos como atividade locomotora e na busca de novidades e que estão de acordo com a literatura que mostra que os ratos HE apresentam hiperatividade motora e aumento do comportamento de *rearing* em relação aos LE. Vários estudos como Steimer e Driscoll (2005) avaliando bases temperamentais em roedores caracterizaram dois extremos de comportamento em ratos, para eles chamados *high avoidance* (RHA) e *low avoidance* (RLA), ou seja, com alta e baixa fuga ao dano. Para Cloninger e Svrakic (1993) evitar danos (*Harm avoidance*) e busca de novidades (*novelty seeking*) são dimensões independentes do temperamento que podem ser expressos em vários graus. Evitar danos está associado com medo, baixo consumo de energia, pessimismo e timidez, ao passo que a busca por novidades é expressa como curiosidade, impulsividade, esquiva ativa de sinais condicionados de punição e abordagem apetitiva em resposta à novidade e recompensa, estando relacionado com raiva. Neste contexto, a seleção de animais com base no comportamento exploratório é uma ferramenta útil para estudar as bases biológicas do temperamento ou personalidade, uma vez que este é um traço comportamental básico.

Desta forma foi visto que os roedores que expressam elevada atividade exploratória têm tendência para o consumo de drogas de abuso, tais como nicotina (REDOLAT *et al.* 2009), cocaína (BELIN *et al.* 2011) e morfina (PELLOUX *et al.*, 2006). Estes resultados evidenciam alta busca de sensações e busca de novidade em adictos (BLANCHARD *et al.* 2009).

A literatura e os dados mostrados no presente trabalho sugerem que ratos com fenótipo excitatório (alto explorador), podendo receber diferentes nomes na literatura (e.g. RHA, agressivos e HE) demonstram temperamentos 'desinibidos', enquanto aqueles caracterizados por fenótipos depressivos (e.g. RLA, LE e não agressivos) mostram temperamento "inibido". Essas linhas reforçaram a ideia de que a variação natural de extremos de padrão exploratório têm distintos perfis comportamentais, farmacológicos, fisiológicos e neuroendocrinológicos. No caso do presente trabalho resolvemos denominar os animais de HE e LE.

Os dados obtidos no presente trabalho fornecem substanciais evidências que existem grandes diferenças emocionais entre ratos HE e LE. Em primeiro lugar, a exposição forçada a um novo ambiente pode ser considerada aversiva, ansiogênica e/ou estressante (WELKER, 1959; HENNESSY et al, 1979; BARDO et al, 1996). Portanto, as diferenças entre ratos HE e LE no campo aberto podem refletir também diferenças na ansiedade/emocionalidade. Nossos resultados apontam significativa hiperatividade motora e aumento de *rearings* em ratos HE, mas, não, em ratos LE e essa diferença comportamental se manteve mesmo nos grupos HE e LE privados de sono paradoxal. Nessa perspectiva, ao contrário da locomoção, a resposta comportamental de *rearing* é considerada não só como parâmetro de atividade exploratória, mas também emocionalidade (SADILE, 1996; GIRONI CARNEVALE, VITULLO e SADILE, 1990). Em segundo lugar, os parâmetros avaliados no campo aberto: tempo de permanência no quadrante central e razão locomoção central/periferia, os quais também são usados como índice de emocionalidade não diferiram entre os dois grupos HE e LE não expostos ao estresse, entretanto quando os extremos exploratórios foram expostos ao estresse da privação do sono paradoxal o grupo HE privado de sono apresentou maior tempo e razão gasto no centro do campo aberto, corroborando com os dados obtidos por Courvoisier *et al* (1996) que mostraram em seu estudo que ratos naturalmente estressados (WKHA) exibiam comportamento ansiolítico e hiperatividade motora em resposta a um ambiente novo como o campo aberto. Dessa forma podemos sugerir que a privação do sono paradoxal potencializou aspectos do fenótipo no grupo HE privado de sono paradoxal relacionada à emocionalidade. Em terceiro lugar, os grupos HE e HE privado de sono caracterizaram-se pelo aumento do comportamento de risco no labirinto em cruz elevado. A privação do sono parece ter o efeito de potencializar o fenótipo alto explorador, uma vez que quando expostos à privação,

houve aumento do número e tempo de entradas nos braços abertos. Em contrapartida os ratos LE respondem de forma aversiva e ansiogênica ao ambiente estressor. Desta forma podemos sugerir que a privação do sono paradoxal parece aumentar a atividade locomotora no grupo LE privado de sono, mas não tem efeito ansiolítico, portanto ele aumenta o número de entrada nos braços abertos, mas não o tempo de permanência nestes braços.

Em nossos resultados os ratos HE exibiram um comportamento ansiolítico no labirinto de cruz elevado, o que pode parecer contra-intuitivo, mas é coerente com a proposta por Cloninger *et al* (1993). Em contraste, ratos LE exibem mais ansiedade. Esses dados estão em alinhamento com o estudo de Kazlauckas *et al* onde camundongos HE mostram menos ansiedade, comportamento mais agressivo contra intrusos, maior prevenção à punição condicionada (choque elétrico na pata) e melhor desempenho em um labirinto com reforço positivo (alimentos), quando comparado com os seus homólogos LE. (KAZLAUCKAS *et al.* 2011). No estudo de Kazlauckas et al. 2011 o grupo HE obteve níveis significativamente mais baixos de congelamento após 24 h do procedimento de choque inicial no teste de medo condicionado. Estes resultados sugerem que os animais HE são menos propensos a desenvolver ansiedade em resposta a estressores condicionados (MALLO, 2006).

Nesta mesma linha Escorihuela e colaboradores, (1999) selecionaram de acordo com o desempenho na esquiwa ativa ratos RHA que são equivalentes aos alto exploratórios (HE) caracterizados no presente estudo, e que mostraram, menor reatividade emocional e medo condicionado, maior comportamento de procura por novidade, aumento da ingestão de álcool e de açúcar e níveis mais elevados de exploração do labirinto elevado do que os RLA.

No presente trabalho, os grupos HE e LE privados de sono paradoxal demonstraram perda cognitiva na fase adulta (P60) através da avaliação da memória de reconhecimento de objetos e de trabalho avaliadas, respectivamente, nos testes de NOR e Ymaze. No que diz respeito à memória e ao desempenho cognitivo, existem numerosos relatos de deficiências nestas funções após a privação do sono. A exemplo, a privação do sono pelo método das múltiplas plataformas resultou em retenção de memória diminuída no teste de esquiwa passiva, uma tarefa dependente do contexto da memória medo (SILVA, ABILIO, TAKATSU, 2004) bem como diminuição do

desempenho de memória espacial no labirinto aquático de Morris (YOUNGBLOOD, ZHOU 1997) e uma redução na potenciação a longo prazo na região CA1 do hipocampo (KIM, MAHMOUD, GROVER, 2005).

O hipocampo é uma área cerebral envolvida na cognição, aprendizagem e memória e continua o seu desenvolvimento ao longo da puberdade e adolescência (ANDERSEN e TEICHER, 2004; YILDIRIM *et al.*, 2008). Portanto, as variações naturais de desempenho em tarefas cognitivas devido à idade ou estado de desenvolvimento (ALTEMUS e ALMLI, 1997; ESMORIS-ARRANZ *et al.*, 2008; SCHENK, 1985), em resposta a estressores vivenciados durante a puberdade também contribuem para as interrupções e prejuízos no desempenho cognitivo (AVITAL e RICHTER-LEVIN, 2005; ISGOR *et al.*, 2004; TSOORY *et al.*, 2007; TSOORY E RICHTER-LEVIN, 2006).

Corroborando com o presente trabalho, o estudo de Isgor *et al.*, (2004) no qual ratos machos foram submetidos a um estressor físico desde antes do início da puberdade até o final deste (P28-P56) e que resultou na idade adulta (P77) em desempenho deficiente no labirinto aquático de Morris (um teste que envolve aprendizagem espacial dependente do hipocampo) (ISGOR *et al.*, 2004).

Desta forma, a exposição a estressores físicos na puberdade contribuem para a ocorrência de déficits na cognição na idade adulta (HOLDER, 2014). O desempenho prejudicado no labirinto aquático de Morris em animais expostos a estresse físico variável durante o desenvolvimento puberal, está correlacionada com uma inibição de crescimento das camadas células piramidais CA1 e na camada de células granulares do giro dentado do hipocampo. Além disso, o estresse pré-púbere também impede a continuação do crescimento da camada de células piramidais de CA3, diminui o volume de CA1 e CA3 do hipocampo e também estão associados com a regulação negativa da expressão GR do hipocampo (ISGOR *et al.*, 2004).

Na avaliação de comportamento tipo-depressivo nos testes do nado forçado e preferência por sacarose mostrou que os animais LE privados de sono apresentaram comportamentos de imobilidade e anedonia em resposta ao estresse. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios com animais selecionados em alto e baixo agressivos pelo teste da natação forçada, em que os ratos baixo agressivos mostraram

maior tempo de imobilidade neste teste (VEENEMA *et al*, 2003). Portanto, o nado forçado tem a finalidade de refletir níveis de impotência, mas também persistência, percepção cognitiva de uma inescapável situação e adoção de estratégias de conservação de energia (WEST, 1990). Isto sugere, portanto, que os animais LE privados de sono são mais propensos à depressão.

Sluyter *et al*, (1999) também selecionou ratos baseados no perfil de agressividade e encontrou que o animais agressivos adotam uma postura defensiva e maior número de *rearing* (exploração vertical), em contraste com uma estratégia passiva de congelamento e alta imobilidade em ratos não agressivos.

Uma correlação negativa significativa, embora não tão forte ($R=-0,61$) foi observada entre comportamentos relacionados com busca de novidade em relação ao tempo de imobilidade no teste de natação forçada, sendo que animais alto respondedores (HR) quando expostos a ambientes novos apresentam comportamento de menor imobilidade e mais natação. Além disso, nessa experiência ratos HR também mergulharam mais no teste de natação forçada (TAGHZOUTI *et al*. 1999).

O teste de preferência por sacarose foi usado para a confirmação de um fenótipo tipo-depressivo, visto que anedonia (a incapacidade de sentir prazer) é uma importante característica da depressão. No presente estudo apenas os ratos LE privados de sono apresentaram uma redução na preferência por sacarose. Este achado está em consenso com a literatura, uma vez que, em um estudo de exposição ao estresse crônico, demonstrou-se que os ratos baixo exploradores consomem soluções doces em quantidades reduzidas, e que este efeito não esteve presente quando os ratos receberam imipramina (KATZ, 1982). Isso reforça a predisposição que o padrão exploratório LE apresenta para transtornos depressivos, quando submetido a situações de estresse. No estudo de Malo (2007) tanto ratos Sprague-Dawley quanto Wistar LE apresentaram comportamento de menor consumo de solução de sacarose. Animais baixos consumidores de sacarose são também menos ativos e mais ansiosos no teste do labirinto em cruz elevado (DE SOUSA *et al*, 1998).

Neste contexto, várias investigações em humanos mostram que temperamentos subjacentes podem predispor e diferenciar transtornos de humor como unipolar ou bipolar. Estudos com o modelo das quatro dimensões de Cloninger *et al*.(1993)

mostram que pacientes com TAB têm alta expressão de características de “busca de novidade” (relacionadas a raiva), enquanto “evitar danos” (relacionados ao medo) é um recurso temperamental mais evidente em pacientes com depressão unipolar (YOUNG *et al.*, 1995; JANOWSKY, 1999; RICHTER, 2000). Em um estudo clínico demonstrou-se também que os temperamentos ciclotímico e hipertímico estão relacionados com a susceptibilidade ao TAB e que temperamento ansioso é mais comum nos pacientes com transtorno depressivo maior e seus familiares (FERREIRA, 20013).

De maneira geral nossos resultados comportamentais com animais HE e LE mostraram que fomos capazes de reproduzir o fenótipo comportamental destes animais, já estudado na literatura. Este diferente fenótipo pode estar relacionado aos grandes erros estatísticos observados nas avaliações comportamentais em linhagens heterogênicas, como Wistar. Mostramos também que os ratos com padrões exploratórios extremos apresentam diferentes respostas ao estresse por privação de sono. Em conjunto os dados demonstram que a seleção de animais em HE e LE pode ser de grande valia para o desenvolvimento de modelos animais de depressão ou TAB estando mais condizente com a realidade da espécie humana, que também exhibe comportamentos individuais distintos quando exposta ao estresse, dependendo do seu temperamento. Portanto, neste estudo sugerimos a associação do modelo de privação do sono paradoxal com o padrão exploratório (base temperamental), haja vista que o temperamento pode modificar a vulnerabilidade de cada pessoa para o desenvolvimento do transtorno de humor. Desde que os temperamentos carregam uma possível influência genética (CLONINGER, SVRAKIC, PRZYBECK, 1993; SMOLLERE e FINN, 2003; AKISKAL, 2005) a seleção de animais baseada no seu padrão exploratório pode favorecer a modelagem de substratos neurobiológicos naturais e prováveis, representando diferenças de temperamento e, carregando possivelmente a predisposição genética para diferentes transtornos de humor.

Vale destacar que o animal HE submetido à privação do sono paradoxal, já é um modelo validado para mania, por apresentar potencialização de comportamentos como hiperatividade, alta atividade exploratória, comportamento de risco e déficit cognitivo compatível com fenótipo TAB. A respeito disso, o perfil de ratos alto exploratórios (alta busca por novidade/baixa evitação de dano) é compatível com o

temperamento hipertímico de Akiskal (MAREMMANI *et al.*, 2005) ou o fenótipo desinibido que predispõe ao TAB (HIRSHFELD-BECKER *et al.*, 2003). Alta exploração é também uma característica observada em indivíduos com TAB e tem sido utilizado para modelar este transtorno em animais (HENRY *et al.* 2010).

Ao contrário dos HE, nos nossos dados, os ratos LE privados do sono paradoxal apresentaram comportamentos como hipoatividade motora, ansiedade, depressão e anedonia. Essas características comportamentais estão em consenso com perfil de ratos baixo exploratórios (baixa busca por novidade / alta evitação de dano) e se assemelham ao temperamento depressivo de Akiskal (MAREMMANI *et al.*, 2005), que está relacionada com pacientes com depressão unipolar ou fenótipo inibido que predispõe depressão unipolar (HIRSHFELD-BECKER *et al.*, 2003).

A perturbação do sono é o pródromo comum de ambos os episódios maníacos e depressivos (JACKSON *et al.*, 2003). Induzida experimentalmente a privação do sono tem sido associada ao agravamento de ambos os sintomas depressivos e maníacos em pacientes com TAB (por exemplo, COLOMBO *et al.*, 1999;. e KASPER WEHR, 1992; WU E BUNNEY, 1990). Nossos dados apontaram que os fenótipos comportamentais de ratos HE e LE foram potencializados quando expostos à privação do sono paradoxal. Estes resultados são amplamente consistentes com a constatação de que as perturbações nos ritmos sociais, incluindo o sono, estão associadas com maior sintomatologia depressiva em adolescentes (GOLDSTEIN *et al.*, 2008). Além disso, ritmos sociais perturbados têm sido associados com o aumento risco para gravidade dos sintomas maníacos e depressivos (FRANK *et al.*, 2005). A depressão, por sua vez, pode ser precipitada quando ritmos circadianos são perturbados por condições ambientais como no trabalho em turnos (shift-work), jet lag e privação de sono. Desregulação na atividade do ciclo é uma importante causa de recidivas de humor no TAB (ROSENBERG *et al.*, 2011).

Partindo das evidências que mostram a base genética do temperamento e tendo em vista a importância da privação de sono para o desenvolvimentos de padrões comportamentais alterados, nesse estudo foi investigada a expressão hipocampal de sete genes do ritmo circadiano (genes CLOCK principais) por meio dos níveis de RNA mensageiro em subgrupos HE e LE. Além disso, foi investigado o efeito da privação do

sono paradoxal, que é um modelo bem estabelecido de desregulação do ciclo circadiano, nos níveis de expressão desses genes nos subgrupos selecionados. O hipocampo foi selecionado por ser uma área importante na regulação das emoções.

Nos últimos anos, um crescente escopo de evidência tem destacado a participação de perturbações nos ritmo circadiano na fisiopatologia dos transtornos de humor, em especial depressão maior, transtorno bipolar e transtorno afetivo sazonal. Nesse sentido, desde sua publicação em 1994, o DSM IV tem inserido sintomas relacionados à desregulação do ciclo circadiano em seus critérios diagnósticos, e cada vez mais terapias baseadas em seus efeitos sobre a duração e regularidade do ciclo circadiano tem emergido. De fato, distúrbios do ciclo sono/vigília são característicos no TAB. Independentemente da fase do humor, esses pacientes apresentam maior latência para início do sono e despertares frequentes em comparação com controles saudáveis (SELEEM *et al.*, 2014). Em uma compilação de estudos sobre as alterações do sono em diferentes estágios do TAB, foi identificado que durante os episódios de mania, 69-99% os pacientes apresentam diminuição da necessidade de sono (como característica chave do quadro), e nos episódios de depressão, 23-78% dos doentes apresentaram episódios de hipersonia e mais de 50% dos pacientes de insônia (SELEEM *et al.*, 2015). Quanto à depressão unipolar, são frequentes os sintomas de aumento da latência para adormecer, despertares precoces, redução da eficiência do sono e do tempo total de sono, e densidade mais elevada de sono REM (ROBILLARD *et al.*, 2013). Anormalidades do sono são semelhantes na depressão bipolar e unipolar, no entanto, neste último caso, parece haver uma frequência aumentada de despertares precoces e uma densidade mais elevada de sono REM em estudos polisonográficos (ROBILLARD *et al.*, 2013; ROBILLARD; NAISMITH; HICKIE, 2013).

Além desses sistemas de retroalimentação direta, alças auxiliares exercem influência sobre a expressão dos genes circadianos e são denominados, em conjunto, de genes controladores do CLOCK, “clock-controlled genes” (CCGS) e parecem contribuir para a transmissão dos sinais circadianos exógenos para a maquinaria nuclear do relógio (REPPERT e WEAVER, 2002).

Nesse contexto, nossos resultados demonstraram que basalmente os animais selecionados pela atividade exploratória apresentaram diferenças significativas na expressão dos genes principais do ciclo circadiano. Foi possível identificar que os

animais LE apresentaram níveis significativamente mais elevados de expressão dos genes CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, PER3 e CRY1 nas amostras de hipocampo em relação aos animais com fenótipo HE. Excepcionalmente, o gene CRY2 não apresentou diferenças consideráveis nos níveis de expressão hipocampal basal nos grupos selecionados.

Consideráveis evidências têm apontado para o fato de que polimorfismos nos principais genes do ciclo circadiano estão consistentemente associados com transtornos de humor, em especial TAB. Vários estudos tem investigado a presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) no gene CLOCK em pacientes com TAB. Esses estudos revelaram que pacientes portadores de uma substituição de timina (T) por citosina (C) na posição 3111 deste gene (SNP T3111C) (perfil heterozigoto), apresentam em relação aos indivíduos sem esse SNP um cronotipo noturno, com um início relativamente tardio do sono e um tempo total inferior de sono (BENEDETTI *et al.*, 2003, 2004) Além disso, a homozigose para esse alelo T3111C em relação à heterozigose foi associada a um aumento de cerca de duas vezes na taxa de recorrência de crises afetivas, maior severidade dos sintomas de humor e insônia (SERRETTI *et al.*, 2003 e SERRETTI *et al.*, 2005). Interessantemente, este polimorfismo não confere maior susceptibilidade para transtorno depressivo maior (DESAN *et al.* 2000). Em estudos em animais, ratos com mutações neste gene demonstraram um comportamento semelhante à mania, com hiperatividade, diminuição da duração de sono e cronotipo noturno, redução de ansiedade/aumento de comportamento exploratório e alterações do filtro sensorio-motor (ROYBAL *et al.*, 2007 e VAN ENKHUIZEN *et al.*, 2013).

Em 2006, um estudo conduzido por Mansour e col., analisou 46 SNPs em 8 dos genes do relógio (BMAL1, CLOCK, PER 1, 2, 3 CRY 1,2, TIMELESS) em uma amostra de pacientes com TAB tipo 1, esquizofrenia, e transtorno esquizoafetivo. Também foram analisadas amostras de parentes desses pacientes não doentes, e de indivíduos saudáveis sem história familiar desses transtornos. Esses pesquisadores identificaram uma alta frequência de transmissão de haplótipos codificando 5 SNPs (rs1982350, rs2896635,rs2278749, rs969486 and rs2290035) do gene BMAL1 na amostra de pacientes com TAB. Quando analisada a distribuição desses SNPs, quatro SNPs (rs2896635, rs2278749, rs969486 and rs2290035) mantiveram uma alta distribuição na população com TAB tipo 1 em relação à população controle. Esse estudo

também revelou uma alta frequência de transmissão e distribuição de SNPs (rs2279665, rs774026, rs2291738 e rs2291739) do gene TIMELESS na população com TAB. Associações com os genes BMAL e TIMELESS também foram identificadas na população parental dos pacientes com TAB, entretanto para diferentes SNPs (MANSOUR *et al.*, 2006a). Adicionalmente, o gene BMAL tem sido frequentemente correlacionado com distúrbios do sono, como atenuação do ciclo sono/vigília, fragmentação, cronotipo noturno e aumento total da duração de sono em pacientes saudáveis e com transtornos de humor (LE-NICULESCU *et al.*, 2008a; NIEVERGELT *et al.*, 2006).

Em relação aos genes Per, algumas evidências sugerem que o gene Per3 seria o mais relacionado com o TAB (MANSOUR *et al.*, 2006b; NIEVERGELT *et al.*, 2006). Mutações neste gene foram relacionados com a idade de início precoce da doença, resposta ao tratamento e flutuações circadianos de humor (ARTIOLI *et al.*, 2007 e RYBAKOWSKI *et al.*, 2014). Mais recentemente, o gene Per2 também tem sido relacionado com o efeito terapêutico de lítio (MCCARTHY *et al.*, 2016). Os genes Per também apresentam uma forte relação com o ciclo sono/vigília. Polimorfismos no gene Per1 apresentam associação com um cronotipo diurno enquanto polimorfismos no gene Per3 estão principalmente associados com cronotipo noturno (ARCHER *et al.*, 2003). Ademais, um avanço de fase de sono foi encontrada em pacientes com polimorfismos do gene Per1 (CARPEN *et al.*, 2006), mutação deletéria no Per2 (TOH *et al.*, 2001) e com polimorfismo de alelo longo (6-8 repetições de nucleotídeos) no gene Per3. Em contraste, os pacientes com o alelo curto (2-5 repetições) do mesmo polimorfismo apresentam fase do sono atrasada (ARCHER *et al.*, 2003).

Sobre genes criptocromos, cry2 tem sido o mais relacionado ao TAB (MANSOUR *et al.*, 2009), especialmente com pacientes cicladores rápidos (SJOHOLM *et al.*, 2010). Mais recentemente, uma variante em Cry1 (rs8192440) foi, nominalmente, associada a uma boa resposta ao tratamento com lítio (MCCARTHY *et al.*, 2011). Ambos estão envolvidos na regulação homeostática do sono, cry1 está associado com a fase do sono avançada e com cry2 fase do sono atrasada (OKAMURA *et al.*, 1999).

Em relação ao espectro da personalidade, alguns estudos tem investigado a associação entre os ritmos circadianos e traços específicos da personalidade. Nesse contexto, Caci *et al.* (2004), utilizando o Inventário de Temperamento e Caráter de

Cloninger (TCI) constatou que o cronotipo diurno foi negativamente correlacionado com o traço de Busca de Novidade, e positivamente relacionado com o traço de Persistência. Ottoni *et al.* (2012) mostraram uma associação de temperamento ciclotímico e eufóricos (mais frequentes nos períodos de mania), avaliados pela Escala Afetiva e Emocional Composta (*Affective and Emocional Composite Scale*) (OTTONI; ANTONIOLLI; LARA, 2012). Jankowski (2013), por sua vez, identificou a associação entre cronotipo noturno e maior reatividade emocional e menor persistência (Jankowski, 2013)

Em relação aos genes do ciclo circadiano, pesquisadores japoneses (TSUCHIMINE *et al.*, 2013) encontraram uma associação entre o polimorfismo C3111T do gene CLOCK, o qual consistentemente tem sido associado ao aumento da susceptibilidade e severidade do TAB, e o traço do temperamento de dependência de recompensa em indivíduos saudáveis. Artioli *et al.* (2007), por sua vez, observaram uma associação entre polimorfismo do gene PER3 e o traço de busca de novidade. Mais recentemente, a associação entre os genes do ciclo circadiano e as dimensões do temperamento em pacientes com TAB foi descrita. Rybakowski *et al.*, 2014, evidenciaram uma forte associação entre o gene BMAL1 (SNPs rs4146388, rs7107287) e temperamentos hipertímicos (altos escores de busca por novidade) e ansiosos (altos escores de ED). Também foi reportada uma forte associação entre o temperamento depressivo e SNPs (rs228727) do gene Per3 (RYBAKOWSKI *et al.*, 2014). Interessantemente, como comentado anteriormente, estudos prévios identificaram uma alta transmissão e distribuição do SNP rs7107287 BMAL1 em amostras de pacientes com TAB tipo 1 (MANSOUR *et al.*, 2006).

Em relação aos estudos pré-clínicos, tem sido demonstrado que a expressão alterada do genes do ciclo circadiano podem contribuir para as diferenças entre os componentes da emocionalidade entre indivíduos. Nesse sentido, Roybal *et al.*, 2007 demonstraram que ratos portadores de deleção genética do gene CLOCK exibem um conjunto de alterações comportamentais muito semelhantes às identificadas no espectro maníaco do TAB, incluindo hiperatividade, menor necessidade de sono, menos ansiedade, menos comportamento tipo-depressivo, e aumento da comportamento de busca por recompensa. Além disso, esses animais apresentaram um aumento da atividade dopaminérgica na área tegmentar ventral, e atenuação do comportamento tipo-

maníaco após a administração de drogas estabilizadoras do humor, como lítio, ou após a restituição da expressão gênica do CLOCK (ROYBAL *et al.*, 2007). Outro trabalho interessante conduzido por Le-Niculescu *et al.*, 2008, evidenciou que ratos *knock out* para o gene controlador do ciclo circadiano (CGS) proteína ligadora D-box (Dbp) apresentam vulnerabilidade aumentada a eventos precipitantes de crises de humor, de nota, quando submetidos a eventos estressores crônicos (3 semanas) apresentam exacerbação do comportamento tipo-depressivo, e quando submetidos à privação paradoxal do sono, exacerbação de comportamentos tipo-maníacos (LE-NICULESCU *et al.*, 2008).

No campo do temperamento, importante contribuição foi recentemente dada por Kerman *et al.*, 2012. Esses pesquisadores demonstraram que ratos selecionados em alto reativos (HR) e baixo reativos (LR) de acordo com o padrão de atividade locomotora induzida pela novidade apresentaram padrões divergentes de ritmo diurno/noturno de atividade e expressão dos genes do relógio circadiano. Especificamente, foi evidenciado que os animais HR apresentaram maior padrão de atividade noturna, compatível com um cronotipo noturno, comparado aos animais LR, que apresentaram um padrão de atividade predominantemente diurno. Em relação à expressão dos genes do ciclo circadiano, os animais HE apresentaram níveis reduzidos de expressão do gene CLOCK no núcleo supraquiásmico do hipotálamo, e níveis reduzidos de expressão do gene Per2 na área tegmentar ventral quando comparados aos animais LE (KERMAN *et al.*, 2012). Portanto, em conjunto, é possível concluir que os nossos achados de expressão basalmente reduzida dos genes do ciclo circadiano (CLOCK, BMAL1, Per1, Per2, Per3 e Cry1) nos animais selecionados no polo HE em relação ao animais LE são consistentes com os dados prévios da literatura que demonstram padrão de expressão similar em animais selecionados pela resposta à novidade (KERMAN *et al.*, 2012), bem como dialogam com os dados de modelos de deleção genética dos genes CLOCK e moléculas relacionadas que resultam em um fenótipo comportamental de hiperreatividade e hiperlocomoção (LE-NICULESCU *et al.*, 2008; ROYBAL *et al.*, 2007). Vale destacar que a avaliação destes genes em animais HE e LE ainda é incipiente na literatura.

A fim de investigar os efeitos da privação paradoxal do sono REM sobre a maquinaria de expressão dos genes do ciclo circadiano e a possível influência do

temperamento frente a esse evento, nós conduzimos uma avaliação da expressão dos genes principais do ciclo circadiano (CLOCK, BMAL1, Per1, Per2, Per3 e Cry1) nos animais selecionados em HE e LE de acordo com o padrão de atividade exploratória frente à novidade.

Na sociedade contemporânea, a privação crônica do sono está se tornando incrivelmente comum. Há um grande montante de evidências que a privação do sono em seres humanos aumentam a susceptibilidade a diversas doenças, infecciosas e crônicas, como diabetes, câncer e transtornos mentais (LAMONT et al., 2007; YANG et al., 2008). Em relação a esse último grupo de doenças, estudos apontam que a redução ou privação do sono pode desencadear em indivíduos susceptíveis episódios agudos de mania ou hipomania. Usualmente, alterações importantes do sono precedem relapsos ou recorrências de episódios de mania e depressão. Além disso, marcantes alterações neurocognitivas, como déficit de atenção, capacidade executiva, aprendizagem e comprometimento em vários domínios da memória, especialmente declarativa, tem sido associadas à privação ou distúrbios de sono (FERNANDES-SANTOS et al., 2012; KREUTZMANN et al., 2015; YANG et al., 2008)

Em roedores, os efeitos comportamentais da privação do sono tem sido estudados comumente pelo método de privação pela plataforma submersa, o modelo utilizado no presente estudo. Nesse estudo, foi demonstrado que a PSP foi capaz de alterar drasticamente os níveis hipocâmpais de expressão dos genes do ciclo circadiano (CLOCK, BMAL1, Per1, Per2, Per3 e Cry1) com padrão diferencial de acordo com o grupo de animais selecionado por suas características temperamentais. Merece destaque o fato de que o grupo HE apresentou um aumento da expressão dos genes citados após a privação paradoxal do sono, enquanto os animais LE exibiram uma redução da expressão desses genes. Excepcionalmente, em relação à expressão do gene Cry2, nós observamos um padrão semelhante de redução dos níveis hipocâmpais de RNAm desse gene em ambos os grupos selecionados HE e LE.

Os achados na literatura acerca dos efeitos da privação de sono paradoxal sobre a expressão dos genes do ciclo circadiano são conflitantes. Algumas evidências demonstram uma redução da transcrição desse genes após a privação do sono paradoxal, enquanto outras evidenciam o aumento de seus níveis de expressão. Estudos mais recentes, porém tem apontado que os genes do ciclo circadiano parecem ter uma

resposta tempo-diferencial a privação do sono, por exemplo, os níveis de expressão dos genes *Per 1* e *Per2* usualmente aumentam de forma mais precoce, após cerca de duas horas de privação de sono, enquanto os níveis dos genes *BMAL1* e *NPAS2* aumentam geralmente com tempo mais prolongados, após cerca de seis horas (WISOR et al., 2002, 2008). Além disso, foi demonstrado que a privação de sono pode comprometer significativamente, por meio de mecanismos epigenéticos, a ligação de alguns fatores de transcrição às regiões promotoras de genes reguladores do ciclo circadiano. Esse é o caso da ligação dos fatores de transcrição *BMAL/CLOCK* às regiões promotoras dos genes *Per1* e *DBP*, a qual é comprometida após 6 horas de PSP, o que resulta na redução da expressão desses genes (BUNNEY; BUNNEY, 2013; MONGRAIN et al., 2011). Vale destacar que, até onde nós sabemos, este é o primeiro trabalho a avaliar a expressão destes genes do relógio biológico em animais HE e LE submetidos à privação do sono paradoxal.

É importante mencionar que a privação de sono é capaz de induzir importantes alterações nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgica, especialmente no sistema dopaminérgico. Classicamente, o sistema dopaminérgico está implicado na fisiopatologia no TAB, e estados hiperdopaminérgicos usualmente cursam com alterações mania-símile (FREY *et al.*, 2006; YOUNG *et al.*, 2010). Nesse sentido, foi demonstrado, por meio de estudos de microdiálise, que a privação do sono paradoxal por 6 horas promove um considerável aumento dos níveis extracelulares dos metabólitos da serotonina e dopamina, respectivamente 5-HIAA, e DOPAC e HVA nos núcleos da base (ZANT *et al.*, 2011) Além disso, ratos privados do sono apresentaram um aumento da densidade dos receptores dopaminérgicos, em especial, D1R e D3R em amostras de corpo estriado, bem como aumento da atividade da adenilato ciclase estimulada pela dopamina (DEMONTIS *et al.*, 1990; LIM *et al.*, 2011). Corroborando com esses dados no presente trabalho houve o aumento dos receptores D2 após a privação do sono paradoxal em ratos HE. Portanto, tais dados fornecem evidências de que a privação do sono está associada a uma remodelação dos circuitos cerebrais dopaminérgicos, em especial uma ativação desse sistema de neurotransmissão, o que pode estar potencialmente vinculado às alterações comportamentais e neurobiológicas envolvidas nesse modelo.

Nesse estudo, a explicação para o padrão de expressão geral dos genes circadianos após a privação do sono paradoxal nos grupos selecionados de acordo com a atividade exploratória frente à novidade permanece intrinsecamente elusiva, entretanto nós hipotetizamos que as características temperamentais forneçam um substrato diferencial de vulnerabilidade para os efeitos neurobiológicos da privação do sono paradoxal. Em especial, nós sugerimos a participação do sistema de neurotransmissão dopaminérgico nos efeitos observados na expressão dos genes circadianos após a PSP. Como comentado anteriormente, a PSP cursa em animais saudáveis com um aumento da densidade e da ativação de alguns subtipos de receptores de dopamina. Recentemente, foi demonstrado que o aumento da sinalização dopaminérgica prolonga a duração do ritmo circadiano e causa um fenótipo comportamental mania-símile em animais *knock-out* para o transportador de dopamina (DAT). (Landgraf et al., 2016). Além disso, a ativação dopaminérgica promoveu no núcleo supraquiasmático e em culturas de células hipocâmpais um aumento da expressão circadiana dos genes relógio, em especial do gene *Per2* (LANDGRAF *et al.*, 2016). O estudo conduzido por Hood *et al.*, (2010) corroboram esses achados ao demonstrar que a ativação dos receptores D2R controla o pico de transcrição diária do gene *Per2* e que o bloqueio desses receptores ou a depleção dopaminérgica pela 6-OH-dopamina no núcleo estriado inibe a expressão circadiana desse gene (HOOD *et al.*, 2010).

Além disso, há evidências de que a dopamina modula o comportamento buscador de novidade em animais. Nesse sentido, foi demonstrado que estímulos novos excitam neurônios dopaminérgicos e ativam áreas cerebrais que recebem aferências dopaminérgicas. Animais submetidos ao bloqueio farmacológico ou genético da recaptação de dopamina exibem um aumento do comportamento de busca por novidade (COSTA et al., 2014; YOUNG; KOOISTRA; GEYER, 2011). Não apenas isso, animais que apresentam alta reatividade à novidade apresentam um aumento da densidade de receptores D2/D3R no núcleo accumbens e corpo estriado dorsal (JUPP *et al.*, 2016), evidenciado neste trabalho aumento de receptor D2 no hipocampo de ratos HE expostos à privação do sono paradoxal. Portanto, nesse estudo, hipotetizamos que os animais selecionados pelo traço de exploração frente à novidade em HE e LE apresentam um substrato basal diferencial de ativação dopaminérgica que contribuiria para os efeitos observados da privação do sono paradoxal na expressão dos genes do ciclo circadiano. A redução basal dos níveis de D2R em animais HE não

privado do sono pode refletir uma infraregulação destes receptores com o intuito de reduzir a ativação excessiva dos mesmos. É importante notar que esta infraregulação foi vista na expressão do gene e na proteína.

Na verdade, as alterações transcricionais de expressão gênica do "relógio" no sistema mesolímbico (isto é, o corpo estriado) foram relatados após ambos os tratamentos com cocaína e metanfetamina (NIKAIDO *et al.*, 2001; IJIMA *et al.*, 2002;.. YUFEROV *et al.*, 2003; UZ *et al.*, 2005; LYNCH *et al.*, 2008). Além disso, através de estudos com antagonistas desses receptores, tem sido sugerido que os sistemas de receptores, incluindo os receptores DA (i.e. D1), medeiam alterações na expressão de genes do relógio induzidas pela metanfetamina nesta região do cérebro (NIKAIDO *et al.*, 2001). Culturas de neurônios striatais tratadas com agonistas do receptor de dopamina D2 / D3 quinpirole demonstrou um efeito inibitório na expressão gênica para *mClock* e *mPer1*. Em contraste, o tratamento com um agonista D1 chamado SKF 38393 produziu um efeito estimulador generalizado sobre os mesmos genes. (IMBESI, 2009). Vale salientar que estes estudos ainda não foram conduzidos no hipocampo.

Mais recentemente, o aumento da expressão e fosforilação da tirosina hidroxilase, enzima etapa limitante na síntese de DA, foi reportada na área tegmental ventral de mutantes de genes *CLOCK* em resposta aos mecanismos de recompensa induzidos por cocaína (MCCLUNG *et al.*, 2005).

Outros estudos têm investigado os substratos neurobiológicos dos perfis comportamentais de HE e LE. Ratos HE têm altos níveis basais e estimulados de dopamina extracelular no estriado, mas não no núcleo accumbens (MALLO *et al.*, 2007), e uma proporção mais elevada de receptores de dopamina-D2 no estado de alta afinidade funcional (ALTTOA *et al.* 2009). Para isso sugerimos que os animais HE apresentariam um perfil comportamental e genético fortemente modulado pela interação dos genes do relógio biológico e sistema dopaminérgico. Além disso, susceptibilidade para transtornos de humor, tais como o TAB.

Por outro lado, animais LE têm níveis significativamente mais elevados de transportadores de 5-HT no córtex frontal e um maior aumento nos níveis extracelulares de 5-HT depois da administração do inibidor da recaptação de serotonina como o citalopram (MALLO *et al.* 2008). Em paralelo com os dados de MALLO nossos

achados apontam níveis basais aumentados da expressão gênica da enzima de síntese da serotonina (TPH2) em animais LE comparados ao HE, entretanto quando esse padrão exploratório é submetido a um agente estressor como a privação do sono há uma redução brusca na expressão gênica da TPH2 sugerindo para uma possível redução da síntese de serotonina. Como discutido anteriormente o fenótipo LE tem vulnerabilidade maior para estados depressivos, e uma vez que a serotonina é um neurotransmissor de importante envolvimento na depressão, poderia ser um dos mecanismos envolvidos nesta vulnerabilidade.

Usando a análise de microarray nos núcleos da rafe, hipocampo e córtex frontal, Althoa *et al.* (2010) encontraram genes de serotonina, GABA e glutamato diferencialmente expressos em ratos LE e HE e superexpressão de genes envolvidos no desenvolvimento da morfogênese e diferenciação. As vias de enriquecimento envolvidas com sinalização MAPK, potenciação de longa duração, e as vias de depressão em longo prazo. Em outro estudo com perfil de expressão gênica, Clinton *et al.* (2009) encontraram diferenças robustas entre ratos HE e LE durante o desenvolvimento particularmente no hipocampo, e especialmente sobre a função manutenção, desenvolvimento e sinalização intracelular.(CLINTON *et al.*, 2011)

Portanto, a depressão pode ser uma consequência de uma resposta adaptativa alterada ao estresse, e os modelos animais com exposição a diferentes paradigmas de estresse durante a vida, podem perturbar a homeostase normal, levando a alterações patológicas (LOGAN, 2015) incluindo alterações de ritmos biológicos que podem manifestar-se, por exemplo, com alterações do ciclo sono-vigília (TUREK, 2007). Nas bases destas modificações pode haver uma disfunção do relógio circadiano correlacionando-se a intensidade dos principais sintomas depressivos em humanos com o desalinhamento dos ritmos circadianos (EMENS *et al.*, 2009).

No presente trabalho os animais LE apresentaram um perfil comportamental com sinais de depressão e anedonia e redução da expressão gênica Clock, BMAL, Per1, Per2, Per3, cry1 e cry2 após a exposição ao estresse da privação do sono, assemelhando-se ao perfil genético de ratos expostos ao estresse moderado imprevisível. Para Calabrese *et al.*, (2015) o seu estudo fornece evidências de que os animais expostos ao estresse moderado imprevisível (CMS) mostram alterações crônicas da máquina de genes do relógio, que é essencial para manter os ritmos

circadianos. As alterações produzidas pelo CMS produziu um fenótipo do tipo depressivo com sugestivas alterações na transcrição e tradução dos genes de relógio principalmente no córtex pré-frontal. Mesmo que, sendo um ciclo difícil de estabelecer uma consecução temporal das alterações observadas, no córtex pré-frontal, a redução dos níveis de expressão gênica e protéica de BMAL1 e Clock no compartimento nuclear após a exposição CMS foi responsável pela redução da expressão de Rev-Erb, cry2, Per1 e Per2. Uma vez que em condições fisiológicas, o heterodímero Clock/BMAL1 controla a expressão nuclear de genes controlados pelo relógio (CCG) e genes interligados com alça de feedback do ciclo. Portanto, ele conclui que a diminuição do Clock/BMAL1 reduziu a expressão gênica de cry2, Per1 e Per2. (Calabrese et al., 2015). Uz e colegas mostraram que o tratamento de fluoxetina crônica produziu um aumento significativo na expressão de genes clock, Bmal1, Per2, cry2 no hipocampo de ratos normais (UZ *et al.*, 2005) .

Essas alterações gênicas podem estar relacionadas a uma possível ligação entre a exposição ao estresse e à disfunção dos genes do relógio que é representada por alterações da função no eixo HPA. Em primeiro lugar, a concentração de corticosterona plasmática desempenha uma variação dependente do tempo em animais noturnos e diurnos e (BUIJS, KALSBECK , 2001), é um fenômeno que é controlado tanto pelo relógio principal no SCN como por relógios periféricos dentro da glândula suprarrenal (NADER, 2010; SO, 2009). A atividade dos hormônios glicocorticoides mediada por receptores de glicocorticoides (GRS) que, após a ligação ao seu ligando endógeno, entram no núcleo, e interagem com elementos de resposta aos glicocorticóides (GRE) nos promotores dos genes, levando a regulação da transcrição de diferentes genes.

Em seu estudo Calabrese (20015) mostrou que os níveis de proteína de GRS foram significativamente reduzidos na fração nuclear do córtex pré-frontal de ratos CMS, um efeito que foi normalizado por tratamento com antioxidante. Além disso, os efeitos observados nos níveis da proteína GR podem ter contribuído para a redução encontrada nos níveis de RNAm dos genes PER e redução dos níveis de proteína Cry1 combinados com insuficiência GR encontrados no nosso modelo de estresse, o que pode ter afetado a expressão de uma vasta variedade de genes, estendendo-se os mecanismos potencialmente afetados no estresse crônico moderado.

Considerando que GC regulam a expressão de Per1 através do elemento de resposta a GC (GRE) na sua região promotora, os mecanismos moleculares da expressão Per2 mediada por GC não foram claramente elucidados (BUIJS, KALSBECK, 2001) mas ele é responsivo aos glicocorticóides (SO, 2009). Por conseguinte, demonstrou-se recentemente que a expressão de Per2 também é mediada por BMAL1-dependente da ligação de GR em GRE presente na sua região promotora (CHEON, 2003). Além disso, a interação de cry1/2 com receptor de glicocorticóides (GR) pode alterar sua resposta transcricional mediada por glucocorticóides (LAMIA *et al.*, 2011).

Recentemente o efeito da exposição prolongada ao estresse sobre a expressão dos genes de relógio foi analisada em regiões do cérebro tais como hipocampo, amígdala e o núcleo accumbens. Com efeito, tem sido demonstrado que os níveis de proteína foram moduladas pelo relógio no hipocampo, mas não no SCN, dos ratos estressados (JIANG *et al.*, 2013).

Em estudo recente, *post mortem* em humanos mostrou que em indivíduos saudáveis do grupo controle apresentam genes BMAL1 (ARNTL1), PER1-3, Dec1 / 2, REVERB α , e PAD ritmicamente expressos em regiões do cérebro envolvidas na regulação do humor, mas estes ritmos são atenuados em indivíduos com distúrbio depressivo maior. Embora esses dados não discriminem entre ritmos de genes do relógio reduzidos nos indivíduos com transtorno depressivo maior eles apontam para uma maior variabilidade no avanço de fase de sono nestes pacientes, eles estabelecem que a maquinaria molecular do relógios circadianos no cérebro é afetado no transtorno depressivo maior.

Entende-se que níveis reduzidos de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px), bem como da capacidade antioxidante total tem sido documentada nos pacientes com depressão e TAB quando comparado a controles saudáveis (FREY *et al.*, 2006; HALLIWELL, 2006; ANDREAZZA *et al.*, 2009; BERK *et al.*, 2011; JORNADA *et al.*, 2011).

Foi previamente demonstrado que a privação de sono aumenta o estresse oxidativo no cérebro (VOLLERT *et al.* 2011.; ALZOUBI *et al.*, 2012) e causa redução das defesas antioxidantes endógenas, como os níveis de glutathione reduzida (KHADRAWY *et al.*, 2011), o mesmo é sugerido por D'Almeida *et al.*, (1998) em seu

estudo que demonstrou que 96 h de privação de sono diminuiu os níveis de antioxidantes no hipotálamo, (D'ALMEIDA *et al.* 1998), esses dados são consistentes com a diminuição da atividade da SOD e GPx após 21 dias de privação intermitente do sono REM (recuperação com 6 h de sono por dia) no hipocampo de ratos (SUER *et al.* 2011). E Silva *et al.* (2004) confirma em seu estudo um papel importante do hipocampo no estresse oxidativo em déficits de memória após a privação do sono (SILVA *et al.*, 2004), sugerindo um atraso na recuperação do dano oxidativo induzido por estresse após longos períodos de privação do sono(D'ALMEIDA *et al.* 1998).

Mas, existem controvérsias sobre os efeitos da privação de sono sobre os produtos do estresse oxidativo e antioxidantes. Por exemplo, um estudo anterior demonstrou que longos períodos de privação do sono reduz a atividade da SOD no hipocampo e tronco cerebral, enquanto o neocórtex não mostrou alterações em associação com curto ou longo prazo de privação de sono (MENEZES *et al.*, 2014). Por outro lado Ramanathan *et al.* (2010) demonstrou em seu estudo que 6 h privação sono aumentou antioxidantes no hipocampo, cerebelo, e neocórtex (Ramanathan *et al.* 2010) .

Os achados deste trabalho em relação aos níveis de GSH, um antioxidante fisiológico, demonstraram um perfil diferencial de animais HE e LE após a privação do sono. Uma vez que animais HE mostraram maior vulnerabilidade com redução dos níveis de GSH, por outro lado os animais LE aumentaram a proteção por esse antioxidante.

Menezes *et al.*, (2013) mostraram no seu estudo que ratos privados de sono 24 h exibiram hiperlocomoção em comparação com ratos não privados de sono, sendo encontrada uma correlação positiva no presente estudo entre aumento da atividade locomotora após o estresse da privação do sono paradoxal e peroxidação lipídica no hipocampo tanto em ratos HE quanto LE. Nossos dados também corroboram com estudos que mostraram que 48h e 72 h de privação de sono REM aumenta a peroxidação lipídica em áreas como estriado, hipocampo, e no córtex pré-frontal (KHADRAWY *et al.* ,2011; MENEZES *et al.*, 2013) da mesma forma que 21 dias de privação intermitente do sono REM (SUER *et al.* 2011).

Para Ghosh *et al.*,(1976) “a privação do sono provoca um aumento acentuado na atividade dopaminérgica e concomitante aumento na atividade locomotora”. Do mesmo modo estudos do nosso grupo mostraram um aumento no estresse oxidativo em ratos

que exibiram hiperlocomoção em modelos de mania induzida por LDX.(MACÊDO *et al.* (2013) O mesmo também foi visto em um estudo recente de pesquisa do grupo quando do desenvolvimento de um modelo animal de mania por inibição do transportador de dopamina pelo GBR12909(QUEIROZ *et al.*, 2015). Portanto, o aumento nos níveis de dopamina que é causada pela privação do sono é uma fonte de estresse oxidativo no cérebro, o que pode estar relacionado com o estabelecimento de sintomas maníacos (BERK *et al.*, 2007; REES *et al.*, 2007).

Conforme previamente mencionado, distúrbios do sono são experiências comuns em pacientes maníacos (STRECK *et al.*, 2015), e o modelo de privação de sono paradoxal (PSP) é considerado um modelo animal não farmacológico da mania que induz comportamento maníaco-like (ou seja, hiperlocomoção)(ABRIAL *et al.*, 2015; STRECK *et al.*, 2015; GESSA *et al.*, 1995; GHOSH *et al.*,1976). Neste contexto, o excesso de dopamina liberada aumenta o estresse oxidativo (Streck *et al.*, 2015 ; SILVA *et al.*, 2004; Macêdo *et al.* 2013; QUEIROZ *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo associado ao desequilíbrio de neurotransmissores está envolvido na fisiopatologia do TAB. A produção dopaminérgica excessiva aumenta o estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio no metabolismo de dopamina (MIYAZAKI & ASANUMA, 2008). Além disso, o mecanismo oposto acontece quando o aumento de estresse oxidativo impede a recaptação de dopamina, aumentando, portanto a atividade dopaminérgica (KIM e ANDREAZZA,2012).

Em primeiro lugar, a dopamina (DA) é metabolizada através da monoamina oxidase (MAO) para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido dihidroxifenilacético (MAKER *et al.*, 1981; BERMAN E HASTINGS, 1999). A H_2O_2 , se não for reduzida por mecanismos antioxidantes celulares, tais como GSH e GSH peroxidase, pode reagir com metais de transição tais como o ferro para formar radicais hidroxila (HALLIWELL E GUTTERIDGE,1999). Estas moléculas podem reagir imediatamente com lípidos, DNA e aminoácidos sensíveis, com isso causando danos celulares (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999). Em segundo lugar, a dopamina (DA) podem sofrer hidroxilação não enzimática na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 e formar 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), uma quinona altamente reativa. Esta quinona é tóxica para o sistema nervoso central, e os mecanismos envolvidos nesta toxicidade incluem:

estresse no retículo endoplasmático, ativação da GSK-3 β e fosforilação da tirosina 216, e a inibição de Akt (fosforilação Serina 473) (CHEN *et al.*, 2004).

Também há evidências que associam o estresse oxidativo à hiperativação do sistema glutamatérgico (BERK *et al.*, 2011), bem como uma diminuição da transmissão gabaérgica (BRAMBILLA *et al.*, 2003) no TAB. A hiperatividade glutamatérgica leva a um influxo de cálcio aumentado (PLEIN e BERK, 2001), que aumenta o estresse oxidativo (SHAO *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo também se associou à produção aumentada de glutamato (VOLTERRA *et al.*, 1994; LOVELL *et al.*, 2000). A peroxidação lipídica da membrana plasmática, induzida quando ocorre aumento de estresse oxidativo, se associou a uma diminuição de liberação de ácido gamma-aminobutírico (GABA) em sinaptossomos (PALMEIRA *et al.*, 1993).

Em resumo o estresse oxidativo foi definido como uma perturbação do equilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes, sendo que primeiros tem efeitos potencialmente deletérios para os lípidos, proteínas, DNA e RNA. Estas reações podem incluir a peroxidação de ácidos graxos das membranas celulares, a oxidação de grupos sulfidríla, e inativação de enzimas (BROWN e NAIDO, 2010).

Streck *et al.* (2015), demonstraram que privação de sono paradoxal (por 72h) é capaz de alterar a maquinaria energética cerebral, comprometendo a função da cadeia respiratória mitocondrial, em diversas áreas, como hipocampo, córtex pré-frontal e cerebelo (STRECK *et al.*, 2015), corroborando dados clínicos de disfunção mitocondrial em pacientes com TAB (KONRADI *et al.*, 2004; YOSHIMI *et al.*, 2016). Por fim, estudos também tem reportado que privação do sono paradoxal é capaz de alterar a excitabilidade das membranas biológicas e promover apoptose em neurônios hipocampais, além de retração de seus processos sinápticos. (GUZMAN-MARIN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008).

Além das EROs, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que tem como principais representantes o óxido nítrico (NO•) e o peroxinitrito (ONOO-) (SAKAR e BHADURI, 2001; BOWLER e CRAPO, 2002). A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) catalisa a reação entre L-arginina e oxigênio molecular que resulta na síntese de óxido nítrico. Os níveis de óxido nítrico no SNC geralmente são mensurados indiretamente pela dosagem do seu metabólito nitrito. Em condições fisiológicas, a

expressão gênica e consequentemente a proteína de iNOS é pouco expressa no SNC, resultando em menores níveis de óxido nítrico e seu metabólito nitrito induzidos pela iNOS.

O NO é uma molécula com potencial oxidativo, que reage com o O^{2-} formando peroxinitrito (ONOO-), espécie muito citotóxica (PACHER *et al.*, 2007). Observou-se aumento de dano oxidativo induzido pelo ONOO-, medido pelos níveis de 3-nitrotirosina em 13 cérebros *post-mortem* de pacientes com TAB (ANDREAZZA *et al.*, 2010). Também se encontrou aumento nos níveis de NO em soro e plasma de pacientes com TAB (SAVAS *et al.*, 2002; YANIK *et al.*, 2004; SAVAS *et al.*, 2006; GERGERLIOGLU *et al.*, 2007; SELEK *et al.*, 2008), o que é coincidente com o achado em cérebros *post-mortem*.

Khadrawy *et al.* (2011) demonstraram aumento da produção de NO no hipocampo de roedores após 72 horas de privação do sono REM. Nos dados do presente trabalho foi verificado que animais HE e LE privados do sono elevaram a expressão gênica, e sugerimos apesar de não termos quantificado a proteína, o aumento da expressão protéica da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) acompanhada por aumento dos níveis de óxido nítrico (NO), evidenciado indiretamente por elevação da concentração de nitrito hipocampal tanto em animais HE quanto LE, demonstrando um possível envolvimento do óxido nítrico com a neuroinflamação estabelecida nos subgrupos experimentais.

O sono, o sistema circadiano, e o sistema imunológico são temporalmente integrados para antecipar mudanças ambientais e otimizar adaptações. Durante o sono noturno, hormônios e citocinas pró-inflamatórias são sincronizados para facilitar a iniciação de respostas imunitárias adaptativas nos gânglios linfáticos, enquanto durante a atividade diurna, sinais anti-inflamatórios, hormônios e citocinas aparecem para apoiar funções efetoras inatas. Essas adaptações obedecem ao ritmo 24 h de sono-vigília intrínseco, entretanto, quando esse ciclo é experimentalmente interrompido, a exemplo, do trabalho por turnos, o desempenho mental, o bem-estar e saúde estão comprometidos. (HASTINGS, 2008)

O sistema imunológico e os centros do cérebro de regulação do ritmo circadiano e do sono são bidirecionais e ativamente conectados (BRYANT, 2004; COOGAN,

2008; IMERI, 2009). Alterações imunes induzidas por processos infecciosos podem induzir o sono de ondas lentas, um mecanismo que, como outro aspecto do comportamento da doença pode ajudar a combater patógenos (TOTH, 1995; POLLMACHER, 2000). Citocinas pró-inflamatórias(perfil Th1) como o TNF- α , IL-2, IFN- γ induzem sono de ondas lentas, enquanto citocinas anti-inflamatórias (perfil Th2) como a IL-10, IL-4, IL-13, e fator de transformação de crescimento beta suprimem o sono de ondas lentas. (BRYANT, 2004; MAJDE, 2005, KAPSIMALIS, 2005).

Citocinas são moléculas do sistema imunológico que são secretadas em resposta a um estímulo inflamatório (DANTZER *et al.*, 2011). Essas moléculas podem ser produzidas periféricamente e podem penetrar no sistema nervoso central (SNC) pela barreira hematoencefálica ou por transportadores específicos, ou podem ser diretamente produzidas no SNC por neurônios e por células da glia (CATENA-DELL'OSSO *et al.*).

Nos últimos 20 anos uma série de trabalhos têm relatado uma associação entre a ativação do sistema imunológico e os sintomas psiquiátricos (MIKOVA *et al.* 2001; TUGLU *et al.*, 2003; DOWLATI *et al.*, 2010). Observou-se que a terapia com citocinas pró-inflamatórias, utilizada no tratamento de certos tipos de câncer, hepatite e de algumas infecções virais é capaz de produzir sintomas semelhantes aos sintomas depressivos (PAPANICOLAOU *et al.*, 1998; SCHIEPERS *et al.*, 2005). Essas citocinas são capazes de induzir comportamentos que tem muitas características que se sobrepõem com depressão, incluindo anedonia, anorexia, sono prejudicado e redução da atividade locomotora (DANTZER, 2004). Também foi verificado que no soro de pacientes com depressão grave há aumento das concentrações plasmáticas de interleucina IL-6 (SLUZEWSKA, 1995; LANQUILLON, 2000; BRIETZKE, 2009), que é aparente através do ciclo circadiano (ALESCI, 2005), do mesmo modo também tem sido descritos elevações nos níveis de IL-1 β e TNF na circulação sanguínea periférica e no sistema nervoso central (SNC), em particular, no fluido cerebrospinal. (KAHL, 2005; SCHLATTER, 2004; LANQUILLON, 2000). A indução de NF-kb no cérebro após exposição periférica a IL-1 tem sido demonstrado que medeiam muitos dos efeitos comportamentais da IL-1, incluindo isolamento social e diminuição da ingestão de alimentos (NADJAR,2005).

Além disso, alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados no plasma de pacientes com TAB (FROMMBERGER *et al.*, 1997;

KAESTNER *et al.*, 2005; PACE *et al.*, 2006; MAES *et al.*, 1995; O'BRIEN *et al.*, 2006; HUNG *et al.*, 2007; ORTIZ-DOMINGUEZ *et al.*, 2007). Também foi vista elevação substancial da IL-1 β no líquido céfalo-raquidiano de pacientes com TAB, especialmente se eles tivessem tido episódio recente de mania quando comparado a voluntários saudáveis (Söderlund *et al.*, 2011). A concentração aumentada de IL-1 β no LCR está em excelente concordância com um estudo que mostra níveis aumentados de RNAm de IL-1 β nos cérebros pós-morte de pacientes com transtorno bipolar (RAO e RAPOPORT, 2010). Em alinhamento com esses dados Papiol e Gutierrez sugerem em seu estudo um polimorfismo na região promotora do gene da IL-1 β que confere uma suscetibilidade genética compartilhada para transtorno bipolar e esquizofrenia (PAPIOL E GUTIERREZ, 2004). Assim, a IL-1 β tem sido atribuída a um papel fundamental no comportamento do TAB (DANTZER *et al.*, 2008), sendo que a ação da IL-1 β nos circuitos neuronais parece complexa e diversa, incluindo os efeitos diretos e indiretos sobre a neurotransmissão excitatória e inibitória (PICKERING E O'CONNOR, 2007; VIVIANI, 2007).

Além disso os níveis de RNAm da IL-1 β no cérebro são aumentados após a privação de sono, e esse aumento é mais elevado durante o dia (durante o período de sono normal em roedores) do que a noite (durante o tempo de atividade normal para roedores) (TAISHI, 1998).

Em função destes achados, diversas teorias têm implicado os transtornos de humor como doenças de cunho inflamatório. Essas teorias baseiam-se na idéia de que as citocinas pró-inflamatórias atuam mediando alguns dos aspectos neuroquímicos, neuroendócrinos e comportamentais desses transtornos (DANTZER, 2009).

Os achados acima referenciados reforçam os resultados obtidos no presente estudo, em que animais LE com um maior risco de depressão, apresentaram níveis aumentados de citocinas hipocâmpais pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e a citocina imunomoduladora IL-4 após a privação do sono paradoxal. Da mesma forma os dados de animais HE que são sugeridos para ter um risco maior de TAB apresentaram níveis elevados de IL-1 β e de IL-4 hipocâmpais e plasmáticos após a privação do sono.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a influência das citocinas pró-inflamatórias na etiologia dos transtornos de humor. As citocinas podem afetar o

metabolismo dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (DUNN *et al.*, 2005, DANTZER *et al.*, 2011) em regiões essenciais do cérebro para a regulação da emoção, incluindo o sistema límbico (amígdala, hipocampo e núcleo accumbens), bem como a regulação da função psicomotora e recompensa, incluindo os gânglios basais (GAO, 2002; DUNN, 1999), podem regular o crescimento e a proliferação das células gliais, modular a atividade dos peptídeos opióides endógenos e ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (SILVERMAN *et al.*, 2005). Especificamente, existe uma forte relação entre a IL-1 β e o eixo HPA, tanto no SNC quanto na periferia. A IL-1 β é uma das principais moléculas capazes de ativar o eixo HPA e estimular a secreção de CRH pelos neurônios hipotalâmicos ao ativar vias de transdução de sinal, incluindo proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fator nuclear kB (NF-kB), que contribuem para a disfunção da sinalização do receptor de glicocorticoide. Além disso, na periferia o CRH também é capaz de modular a liberação de IL-1 β , contribuindo para a resposta inflamatória. Foi demonstrado em culturas de monócitos humanos, a administração de CRH é capaz de inibir a síntese de IL-1 β quando as células estão ativadas mas estimula sua produção e liberação em monócitos em estado não ativado, sugerindo que os níveis de toxicidade sistêmica podem influenciar na comunicação em a resposta ao estresse e a inflamação (VAUGHAN *et al.*, 1995; JONES E CHALLIS, 1989; SILVERMAN, 2005, WANG, 2004).

A privação total de sono aguda e desregulação circadiana crônica têm efeitos opostos sobre os níveis de cortisol. Especificamente, uma noite de privação de sono total aumentou os níveis de cortisol, especialmente no início da noite e primeiras horas da manhã e aumentaram os níveis plasmáticos da citocina anti-inflamatória IL-10 e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e proteína C reativa, especialmente durante o estado de vigília programada, já a disfunção circadiana crônica causa diminuição dos níveis de cortisol nas 24 h e pouca ou nenhuma mudança no equilíbrio da razão TNF- α / IL-10 durante a disfunção circadiana. Tomados em conjunto, estes resultados sugeriram que privação do sono aguda e disfunção circadiana associada representam um desafio fisiológico diferente dos dois eventos separados. A privação de sono aguda parece estar associada com um estresse fisiológico/resposta metabólica de níveis maiores de cortisol, especialmente à noite, enquanto a disfunção circadiana crônica parece resultar em uma adaptação fisiológica que reduz os níveis de cortisol em 24 h.

No presente trabalho os níveis de corticosterona em ratos HE e LE expostos a privação do sono paradoxal na adolescência no PN 40 não foram alterados na fase adulta correspondendo ao PN 60. Uma limitação da pesquisa pode ser o fato de não ter sido aplicado estresse agudo, para que fosse evidenciada variações na resposta ao estresse destes animais.

Exames dos efeitos duradouros de estressores no período da puberdade sobre a função do eixo HPA e reatividade ao estresse na vida adulta tiveram resultados um tanto contraditórios. Tem sido geralmente relatado que estressores experimentados na puberdade e adolescência causam hiperatividade do eixo HPA basal (BAZAK *et al.*, 2009; JACOBSON-PICK e RICHTER-LEVIN, 2010; POHL *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2007, 2010.; STERLEMANN *et al.*, 2008; UYS *et al.*, 2006).

É possível interações com ritmos circadianos, haja vista que alguns trabalhos indicam que os níveis corticosterona basal são aumentados de manhã (Schmidt *et al.*, 2007, 2010b; Sterlemann *et al.*, 2008; Uys *et al.*, 2006b) e diminuem na parte da tarde (Sterlemann *et al.*, 2008;.. Toth *et al.*, 2008). Estressores púberes aumentam a corticosterona basal e diminuem a expressão hipocampal de receptor de glicocorticoide (GR) e de mineralocorticoide (MR) na idade adulta (ISGOR *et al.*, 2004;.. SCHMIDT *et al.*, 2007;.. STERLEMANN *et al.*, 2008; UYS *et al.*, 2006), sugerindo duradouras alterações no feedback negativo do eixo HPA.

Em contraste, vários estudos relatam que não há duradouros efeitos de um estressor durante a puberdade em ratos machos ou fêmeas nos níveis basais de corticosterona (WATT *et al.*, 2009;.. WEATHINGTON *et al.*, 2012.) ou que o estresse não induz alterações plasmáticas nos níveis de ACTH ou de corticosterona após exposição a um uma segundo estressor na vida adulta (BOURKE e NEIGH, 2011;.. MASLOVA *et al.*, 2002; MATHEWS *et al.*, 2008; MCCORMICK *et al.*, 2005, 2008;.. TOLEDO-RODRIGUEZ e SANDI, 2007; WILKIN *et al.*, 2012.; WRIGHT *et al.*, 2008). Os estressores utilizados nestes estudos em ratos adolescentes incluíram meios físicos (por exemplo, estresse de restrição, choque nas patas, privação do sono), ou sociais (por exemplo, instabilidade ou isolamento social), ou odor do predador; e na idade adulta alguns foram expostos ao segundo estressor comumente utilizado (por exemplo, estresse de contenção, choque nas patas, plataforma elevada e natação forçada). No entanto, as diferenças de procedimentos podem explicar as aparentes discrepâncias. Em vários

estudos em que nenhum efeito do estressor púbere sobre a reatividade ao estresse no adulto foi relatado, os animais foram experimentalmente estressados no PN30 (MCCORMICK *et al.*, 2005, 2008) ou PN 40 dias de idade (WRIGHT *et al.*, 2008), enquanto que os animais demonstrando alterações na resposta ao estresse na vida adulta experimentaram estressores a partir da pré-puberdade (antes ou no P28) (ILIN E RICHTER-LEVIN, 2009; ISGOR *et al.*, 2004; JACOBSON-PICK e RICHTER-LEVIN, 2010; POHL *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2007; STERLEMANN *et al.*, 2008; WEATHINGTON *et al.*, 2012).

Em paralelo com a capacidade de estressores ativarem cronicamente a micróglia na idade adulta, o que conduz ao aumento dos níveis de citocinas (BILBO e SCHWARZ, 2009), fatores de estresse experimentado na infância ou adolescência induzir alterações de curto e longo prazo na função do sistema imune (DANESE *et al.*, 2007, 2009;. LEMIEUX *et al.*, 2008) e níveis mais elevados de biomarcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), na idade adulta (DINAMARQUÊS *et al.*, 2007).

Para tanto Holder (2014) especula que a vulnerabilidade da puberdade e/ou adolescência de ratos e seres humanos pode ser devido, em parte, o desenvolvimento dos sistemas imunes neurais e indução de neuroinflamação. Evidências até agora sugerem a possibilidade de neuroinflamação como uma via comum pela qual estressor puberal podem alterar o cérebro e comportamento do adulto, especialmente no que se refere a doenças mentais, tais como ansiedade e depressão, assim como aprendizagem, memória e cognição (BILBO *et al.*, 2011;. CRIBBS *et al.*, 2012.; MILLER *et al.*, 2009; SALIM *et al.*, 2012).

Interações semelhantes entre o sistema de relógio e o eixo HPA também são observados na regulação da função imunitária. Nos seres humanos e roedores, o sistema circadiano produz a flutuação circadiana de diversas citocinas, incluindo IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , assim como linfócitos T e B e células natural killer. (LIU, 2006; ARJONA,SARKAR, 2008) ativação do eixo HPA e posterior liberação de glicocorticóides, por sua vez influenciam fortemente atividade imune e resposta inflamatória (Chrousos, 2009; KINO, CHROUSOS, 2005; CHROUSOS, 2001) Concentrações fisiológicas dos glicocorticóides são cruciais para o bom funcionamento do sistema imune, enquanto doses farmacológicas e/ou em altas concentrações

observadas sob estresse suprime fortemente a sua atividade do sistema imune, principalmente por reprimir a atividade de fatores de transcrição/outras moléculas cruciais para a regulação da função imune /inflamação, tais como ativador de proteína (AP-1), NF-kB e STAT5, através da interação proteína-proteína com o GR (CHROUSOS, 2009; KINO, CHROUSOS, 2005; RHEN, 2005). Como muitas células imunes estão na circulação com níveis diminuídos no SNC, o sistema de relógio periférico regula, principalmente, através de fatores humorais, incluindo glicocorticóides, que estão sob o controle do relógio central (ARJONA, SARKAR, 2008). O sistema de relógio pode também regular a função imunitária e conduzir ao desenvolvimento de defeitos imunológicos, em parte por modulação das ações de glicocorticóides endógenos sobre numerosos componentes do sistema imunológico através de uma interação entre a transcrição de fatores Clock/Bmal1 e GR (NADER, CHROUSOS, KINO).

Shi *et al.* (2011) indicou que períodos mais curtos de privação de sono estão associados com rompimento da consolidação da memória (SHI *et al.* 2011). No estudo de Kazlauckas *et al.* 2011 em que ratos HE e LE foram expostos ao estresse moderado crônico foi demonstrado redução da exploração do objeto central em ambos os grupos e que somente no grupo LE houve aumento nos níveis de cortisol e redução nos níveis de BDNF hipocampal. Em contraste, os animais quando expostos ao enriquecimento ambiental aumentaram a exploração do objeto central e os níveis de BDNF em ambos os grupos, com melhora da memória particularmente em ratos LE (KAZLAUCKAS *et al.* 2011).

No entanto há contradições quanto aos efeitos do estresse peri-púbere sobre os níveis de BDNF hipocampal, uma vez que na literatura foram relatados aumento ou nenhum efeito nos níveis de BDNF (TOTH *et al.*, 2008; UYS *et al.*, 2006). De forma intrigante, no trabalho por Toth *et al.* (2008), o aumento de BDNF foi correlacionado com o aumento da neurogênese, o que pode representar uma tentativa de recuperar os efeitos duradouros do estresse sobre o hipocampo do adolescente. Três dias de estresse (natação forçada, plataforma elevada, e choque na pata) durante o período pré-púbere (P26-29) ou período de puberdade precoce (P33-35) de ratos machos são suficientes para induzir o mau desempenho na tarefa de esQUIVA passiva na idade adulta (AVITAL *et al.*, 2006; AVITAL e RICHTER-LEVIN, 2005). Os dados acima referenciados

reforçam os resultados obtidos no presente estudo, em que animais HE e LE apresentaram níveis de BDNF aumentados após o estresse da privação do sono paradoxal, sugerindo um efeito homeostático.

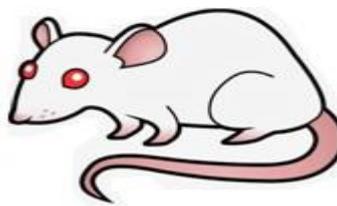
Figura 41 – Ilustração resumo

Ratos LE



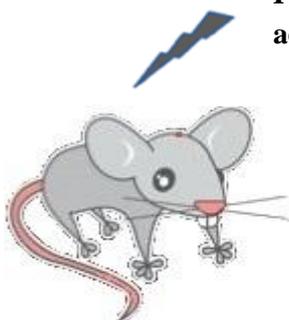
*Hipoatividade motora
Hipoatividade exploratória
Ansiedade, depressão e anedonia*

Ratos HE



*Hiperatividade motora
Hiperatividade exploratória
Comportamento de risco e impulsividade*

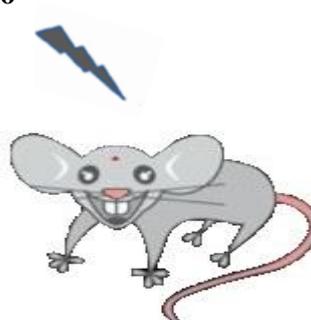
Vulnerabilidade para depressão



**Privação de sono
adolescência**

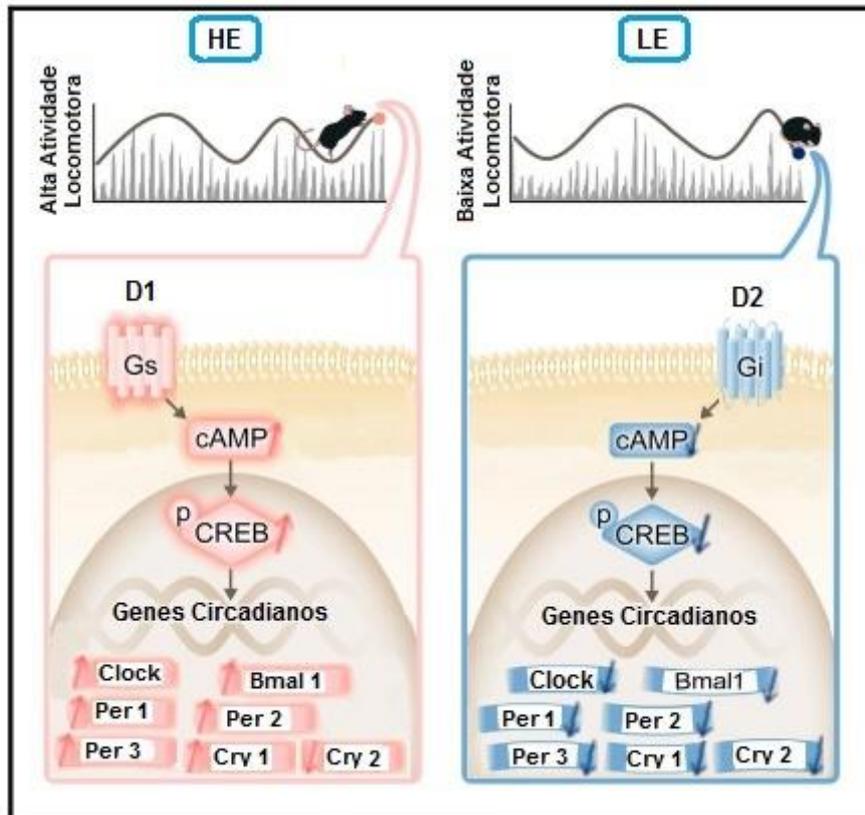
- *Hipoatividade motora*
- *Déficit de memória de trabalho*
- *Depressão e anedonia*
- *Diminuição da expressão de genes Clock*
- *Aumento de GSH*
- *Aumento da peroxidação lipídica*
- *Aumento de citocinas pró-inflamatórias*

Vulnerabilidade para Bipolar



- *Hiperatividade motora*
- *Aumento de rearing*
- *Comportamento de risco*
- *Déficit de memória de trabalho*
- *Aumento da expressão gênica de genes Clock*
- *Aumento de receptor D2*
- *Diminuição de GSH*
- *Aumento da peroxidação lipídica*
- *Aumento de citocinas pró-inflamatórias*

Figura 42 – Esquema da regulação da expressão de dos genes relógio estimulados pela dopamina



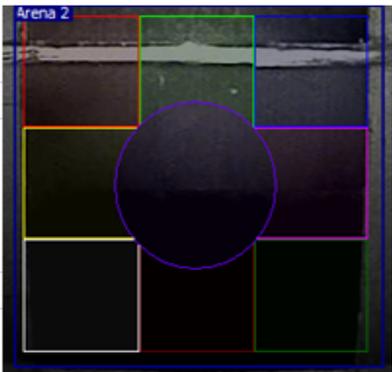
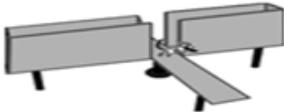
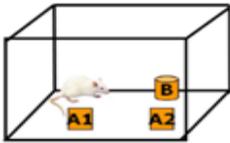
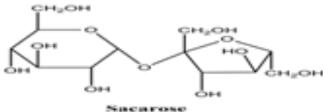
6. CONCLUSÃO

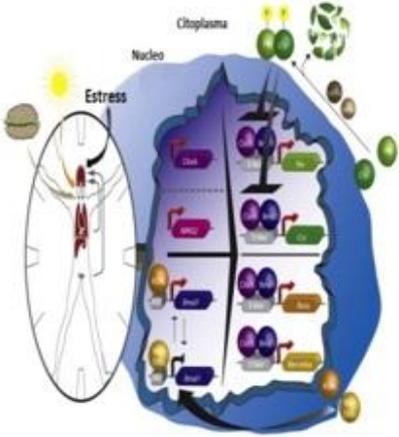
Podemos concluir que os animais HE apresentaram hiperatividade motora, aumento da atividade exploratória e comportamento de risco acompanhado de maior nível de peroxidação lipídica e redução dos genes relacionados ao relógio biológico quando comparado aos animais LE que por sua vez apresentaram hipoatividade motora. Desta forma, animais HE e LE mostram vulnerabilidade genética distinta.

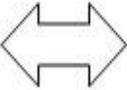
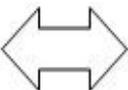
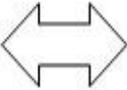
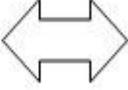
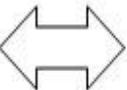
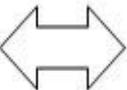
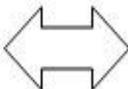
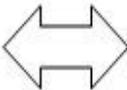
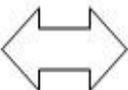
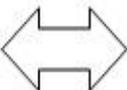
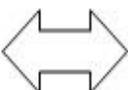
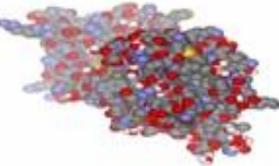
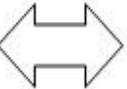
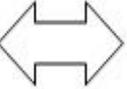
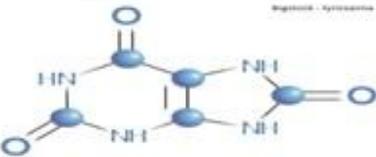
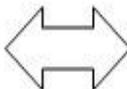
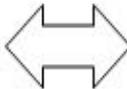
Quando submetidos ao estresse por privação de sono paradoxal na adolescência os animais HE apresentaram aumento da atividade locomotora com comportamento ansiolítico/de risco, comprometimento da memória de trabalho acompanhado de aumento da expressão de genes relacionados ao controle do ciclo sono-vigília e aumento de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo quando comparados aos animais LE, que por sua vez quando expostos ao estresse desenvolveram comportamentos relacionados à depressão.

Dessa forma, nossos resultados apontam para uma forte interação entre padrões exploratórios em animais (associados ao temperamento no ser humano) e eventos estressores na adolescência contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais tipo depressão ou mania na idade adulta, mostrando que a seleção de animais com base no seu padrão exploratório pode ser uma alternativa interessante para a condução de pesquisas com modelos animais com validade translacional em psiquiatria.

Quadro 3 - Resumo esquemático dos resultados obtidos na presente pesquisa

	HE	HE PSP	LE	LE PSP
Campo Aberto	Atividade Locomotora			
	↑	↑	↓	↑
	Rearing			
	↑	↑	↓	↑
	Tempo de Permanência Quadrante Central e razão locomoção			
	↔	↑	↔	↔
Comportamento de risco	↑	↑	↓	↑
	↑	↑	↓	↑
Memória de reconhecimento	↓	↓	↓	↓
	↓	↓	↓	↓
Memória de trabalho	↔	↓	↔	↓
	↔	↓	↔	↓
Imobilidade no Nado forçado	↔	↔	↔	↑
	↔	↔	↔	↑
Preferência sacarose	↔	↔	↓	↓
	↔	↔	↓	↓

Genes do relógio	Clock			
	↓	↑	↑	↓
	Bmal 1			
	↓	↑	↑	↓
	Per 1			
	↓	↑	↑	↓
	Per 2			
	↓	↑	↑	↓
	Per 3			
	↓	↑	↑	↓
	Per 2			
	↓	↑	↑	↓
	Per 3			
	↓	↑	↑	↓
	Cry 1			
	↓	↑	↑	↓
Cry 2				
↑	↓	↑	↑	

 	IL-6 plasmático			
				
	IL-4 tecidual			
				
	IL-4 plasmático			
				
 Corticosterone				
BDNF				
				
 Uric Acid				

Fonte: Do próprio autor. Aumento ↑ Diminuição ↓ Sem alteração ↔

7. REFERÊNCIAS

1. ABRIAL, E.; BÉTOURNÉ, A.; ETIÉVANT, A.; LUCAS, G.; SCARNA, H.; LAMBÁS-SEÑAS, L.; HADDJERI, N. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v.18, p.2, 2015.
2. ANDREAZZA, A.C.; KAPCZINSKI, F.; KAUER-SANT'ANNA, M.; WALZ, J.C.; BOND, D.J.; GONÇALVES, C.A.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.*, v. 34, n.4, p. 263-71, 2009.
3. ANDREAZZA, A.C.; SHAO, L.; WANG, J.F.; & YOUNG, L.T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.*, v. 67, p. 360-368, 2010.
4. AKISKAL, H.S. Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. *J Affect Disord.*, v. 59, n. 1, p. S5-S30, 2000.
5. AKISKAL, K.K.; AKISKAL, H.S. The theoretical underpinnings of affective temperaments: implications for evolutionary foundations of bipolar disorder and human nature. *J Affect Disord.*, v.85, p.231–9, 2005.
6. ALESCI, S. et al. Major depression is associated with significant diurnal elevations in plasma interleukin-6 levels, a shift of its circadian rhythm, and loss of physiological complexity in its secretion: clinical implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.90, p.2522–2530, 2005.
7. ALZOUBI, K.H.; KHABOUR, O.F.; SALAH, H.A.; ABU RASHID, B.E. The combined effect of sleep deprivation and Western diet on spatial learning and memory: role of BDNF and oxidative stress. *J Mol Neurosci.*, v.50, n.1, p.124–133, 2013.
8. AMPOLLINI, P. et al. Temperament and personality features in patients with major depression, panic disorder and mixed conditions. *Journal of Affective Disorders*, v. 52, n. 1–3, p. 203–207, 1999.
9. ARCHER, S. N. et al. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*, v. 26, n. 4, p. 413–5, 15 jun. 2003.
10. ARJONA, A.; SARKAR, D.K. Are circadian rhythms the code of hypothalamic-immune communication? Insights from natural killer cells. *Neurochem. Res.* v.33, p.708–718, 2008.

11. BARDO, M.T; DONOHEW, R.L. and HARRINGTON, N.G. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. **Behav. Brain Res.**, v.77, p.23–43, 1996.
12. BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; DEAN, O.M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YÜCEL, M.; GAMA, C.S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P.V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; & MALHI, G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav.**, v. 35, p. 804-817, 2011.
13. BOWLER, R.P.; CRAPO, J.D. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 166, n.12, p. 38-43, 2002.
14. BRAMBILLA, P; PEREZ, J.; BARALE, F.; SCHETTINI G; & SOARES, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. **Mol Psychiatry.**, v. 8, n. 715, p. 721-737, 2003.
15. ZHANG, J.; ABDALLAH, C. G.; CHEN, Y.; HUANG, T.; HUANG, Q.; XU, C.; ... WU, R. Behavioral deficits, abnormal corticosterone, and reduced prefrontal metabolites of adolescent rats subject to early life stress. **Neurosci Lett.**, v.545, p.132–7, 2013.
16. BELIN, D.; BERSON, N.; BALADO, E.; PIAZZA, P.V.; DEROCHE-GAMONET V. High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, p.569-579, 2011.
17. BENEDETTI, F. et al. A glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene single nucleotide polymorphism is associated with age at onset and response to total sleep deprivation in bipolar depression. **Neuroscience letters**, v. 368, n. 2, p. 123–6, 23 set. 2004.
18. BENEDETTI, F. et al. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. **Behavioural brain research**, v. 187, n. 2, p. 221–7, 5 mar. 2008.
19. BENEDETTI, F. et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. American journal of medical genetics. Part B, **Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 123B, n. 1, p. 23–6, 15 nov. 2003.
20. BLANCHARD, M.M.; MENDELSON, D.; STAMP, J.A The HR/LR model: Further evidence as an animal model of sensation seeking. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 33, p.1145-1154, 2009.

21. BORTA, A.; SCHWARTING, R. K. W. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. **Physiology and Behavior**, v. 84, p. 387–396, 2005.
22. BOYSON, C.O.; HOLLY, E.N.; SHIMAMOTO, A.; ALBRECHET-SOUZA, L.; WEINER, L.A.; DEBOLD, J.F, et al. Social Stress and CRF-Dopamine Interactions in the VTA: Role in Long-Term Escalation of Cocaine Self-Administration. **J Neurosci Off J Soc Neurosci.**, v.34, n.19, p.6659–67, 2014.
23. BRIETZKE, E.; KAUER SANT'ANNA, M.; JACKOWSKI, A.; GRASSI-OLIVEIRA, R.; BUCKER, J.; ZUGMAN, A.; et al. Impact of childhood stress on psychopathology. **Rev Bras Psiquiatr.**, v.34, n.4, p.480–8, 2012.
24. BRIETZKE, E; STERTZ, L; FERNANDES, B.S; KAUER-SANT'ANNA, M; MASCARENHAS, M; ESCOSTEGUY VARGAS, A. et al. Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *Journal of affective disorders*. **Elsevier B.V.**, v.116, n.3, p.214–7, 2009.
25. BROWN, M.K.; NAIDOO, N. The UPR and the anti-oxidant response: relevance to sleep and sleep loss. **Mol Neurobiol.**, v.42, n.2, p.103–113, 2010.
26. BRYANT, P.A.; TRINDER, J.; CURTIS, N. Sick and tired: does sleep have a vital role in the immune system? **Nat.Rev. Immunol.**, v.4, p.457–467, 2004.
27. BUIJS, R.M.; KALSBECK, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, n.7, p.521–526, 2001
28. BUNNEY, B. G.; BUNNEY, W. E. Mechanisms of rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy: Clock genes and circadian rhythms. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1164–1171, 2013.
29. CARPEN, J. D. et al. A silent polymorphism in the PER1 gene associates with extreme diurnal preference in humans. **Journal of human genetics**, v. 51, n. 12, p. 1122–5, 2006.
30. CARR, C.P.; MARTINS, C.M.; STINGEL, A.M.; LEMGRUBER, V.B.; JURUENA, M.F. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: a systematic review according to childhood trauma subtypes. **J Nerv Ment Dis.**, v.201, n.12, p.1007–20. 2013.
31. CARROLL, B.J. The dexamethasone suppression test for melancholia. **Br J Psychiatr J Mental Sci.**, v.140, p.292–304, 1982.
32. CASTANEDA, T.R.; DE PRADO, B.M.; PRIETO, D.; MORA, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. **J Pineal Res.**, v.36, n 3, p. 177–85, 2004.

33. CASTRO, J. E. et al. Personality traits in rats predict vulnerability and resilience to developing stress-induced depression-like behaviors, HPA axis hyper-reactivity and brain changes in pERK1/2 activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, p. 1209–1223, 2012.
34. CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, GP.; LAMBROU, GI.; PAVLAKI, A.; KOIDE ,H.;NG, S.S. et al. Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. **PLoS One.**, v.6, n.9, p.25612, 2011.
35. CHEON, S.; PARK, N.; CHO, S.; KIM, K. Glucocorticoid-mediated Period2 induction delays the phase of circadian rhythm, **Nucleic Acids Res.**, v.41, n.12, p.6161–6174, 2013.
36. CHROUSOS, G.P. Glucocorticoid therapy, In *Endocrinology and Metabolism* (4th edn) (Felig, P. and Frohman, L.A., eds), **McGraw-Hill** p.609–632,2001.
37. CHROUSOS, G.P. Stress and disorders of the stress system. **Nat.Rev. Endocrinol.** v.5, p.374–381, 2009.
38. CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. **Sci. STKE**, p48, 2005.
39. CLINTON, S.M.; STEAD, J.D.; MILLER, S.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Developmental underpinnings of differences in rodent novelty-seeking and emotional reactivity. **Eur J Neurosci.**, v.34, n.6, p. 994-1005, 2011.
40. CLONINGER, C. R.; BAYON, C.; SVRAKIC, D. M. Measurement of temperament and character in mood disorders: a model of fundamental states as personality types. **Journal of affective disorders**, v. 51, n. 1, p. 21–32, out. 1998.
41. CLONINGER, C. R.; SVRAKIC, D. M.; PRZYBECK, T. R. A psychobiological model of temperament and character. **Archives of general psychiatry**, v. 50, n. 12, p. 975–90, dez. 1993a.
42. CLONINGER, C. R.; ZOHAR, A. H. Personality and the perception of health and happiness. **Journal of affective disorders**, v. 128, n. 1–2, p. 24–32, jan. 2011.
43. CLONINGER, C.R.; SVRAKIC, D.M.; PRZYBECK, T.R. A psychobiological model. **Arch Gen Psychiatr.**, v.50, p.975–90, 1993b.
44. COELHO, C. A. O. Comparação de registros de sono (EEG e EMG) lidos em épocas de 10 e 30 segundos de ratos submetidos a privação de sono e tarefa de esquiva inibitória. Botucatu: 2009. Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.

45. COLOMBO, C.; BENEDETTI, F.; BARBINI, B.; CAMPORI, E.; SMERALDI, E., 1999. Rate of switch from depression into mania after therapeutic sleep deprivation in bipolar depression. **Psychiatry Research.**, v.86, p.267–270, 1999.
46. COLOMBO, C.; BENEDETTI, F.; BARBINI, B.; CAMPORI, E.; SMERALDI, E. Rate of switch from depression into mania after therapeutic sleep deprivation in bipolar depression. **Psychiatry Research**, v.86,p. 267–270, 1999.
47. COOGAN, A.N; WYSE, C.A. Neuroimmunology of the circadian clock. **Brain Res.**, v.1232, p.104–112, 2008.
48. COSTA, V. D. et al. Dopamine modulates novelty seeking behavior during decision making. **Behavioral neuroscience**, v. 128, n. 5, p. 556–66, out. 2014.
49. COURVOISIER, H.; MOISAN, M.P.; SARRIEAU, A.; HENDLEY, E.D. and MORME`DE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the KHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Res.**, v.743, p.77–85, 1996.
50. COUTINHO, A.E.; CHAPMAN, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 335, n.1, p.2–13, 2011.
51. D'ALMEIDA, V.; LOBO, L.L.; HIPOLIDE, D.C.; DE OLIVEIRA, A.C.; NOBREGA, J.N; TUFIK, S. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. **Neuroreport.**, v.9, n.12, p.2853–2856, 1998.
52. DALLMAN, R.; TOUMA, C.; PALME, R.;ALBRECHT, U.; STEINLECHNER, S. Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per1 (Brd) mice. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.** v.192, n.7, p. 769–75, 2006.
53. DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **Eur. J. Pharmacol.**, v.500, p.399–411, 2004.
54. DARLINGTON, T.K.; WAGER-SMITH, K.; CERIANI, M.F.; STAKNIS, D.; GEKAKIS, N.; STEEVES, T.D.; WEITZ, C.J, TAKAHASHI, J.S.; KAY, S.A . Closing then circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. **Science.**, v.280, p.1599–1603, 1998.
55. DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci.**, v. 9, p. 46–56, 2008.
56. DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci.**, v.6, n.6, p.463–75, 2005.

57. DE PAULA, H.M.G.; HOSHINO, K. Correlation between the fighting rates of REM sleep-deprived rats and susceptibility to the 'wild running' of audiogenic seizures. **Brain Res.**, v.926, p. 80–85, 2002.
58. DELLU, F.; PIAZZA, P.V.; MAYO, W.; LEMOAL, M.; SIMON, H. Novelty-seeking in rats—biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. **Neuropsychobiology.**, v.34, p.136–145, 1996.
59. DEMONTIS, M. G. et al. Sleep deprivation increases dopamine D1 receptor antagonist [3H]SCH 23390 binding and dopamine-stimulated adenylate cyclase in the rat limbic system. **Neuroscience letters**, v. 117, n. 1–2, p. 224–7, 4 set. 1990.
60. DESOUSA, N.J.; WUNDERLICH, G.R.; DE CABO, C.; VACCARINO, F.J. Individual differences in sucrose intake predict behavioral reactivity in rodent models of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 60, p. 841–6, 1998.
61. DI, S.; MAXSON, M.M.; FRANCO, A.; TASKER, J.G. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. **J Neurosci Off J Soc Neurosci.**, v 29, n 2, p.393–401, 2009.
62. DIMITROV, S.; LANGE, T.; TIEKEN, S. *et al.* Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. **Brain Behav. Immun.**, v.18, p.341–348, 2004.
63. DREXHAGE, R.C.; KNIJFF, E.M.; PADMOS, R.C., VAN DER HEUL-NIEUWENHUIJZEN, L.; BEUMER, W.; VERSNEL, M.A. et al. The mononuclear phagocyte system and its cytokine inflammatory networks in schizophrenia and bipolar disorder. **Expert Rev Neurother.**, v. 10, n.1, p. 59–76, 2010.
64. DUNN, A.J. et al. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.461, p.117–127, 1999.
65. ELLERMANN, C. R.; REED, P. G. Self-transcendence and depression in middle-age adults. **Western journal of nursing research**, v. 23, n. 7, p. 698–713, nov. 2001.
66. EMENS, J.; LEWY, A.; KINZIE, J.M.; ARNTZ, D.; ROUGH, J. Circadian misalignment in major depressive disorder, **Psychiatry Res.**, v.168, n.3, p.259–261, 2009.
67. ENGSTRÖM, C. et al. Bipolar disorder: I. Temperament and character. **Journal of affective disorders**, v. 82, n. 1, p. 131–4, 1 out. 2004.
68. ESCORIHUELA, R.M.; FERNANDEZ-TERUEL, A.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBENA, A.; DRISCOLL, P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats:

- differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. **Physiol Behav.**, v.67, p.19–26, 1999.
69. EVANS, L. et al. Familiarity of temperament in bipolar disorder: Support for a genetic spectrum. **Journal of Affective Disorders**, v. 85, n. 1–2, p. 153–168, 2005.
 70. FARMER, A. et al. A sib-pair study of the Temperament and Character Inventory scales in major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 490–6, 2003.
 71. FERNANDES-SANTOS, L. et al. Sleep deprivation impairs emotional memory retrieval in mice: Influence of sex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, p. 216–222, 2012.
 72. FREY, B.N.; VALVASSORI SS; RÉUS, G.Z.; MARTINS, M.R.; PETRONILHO, FC.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 31, n.5, p. 326-32, 2006.
 73. FRANK, E.; KUPFER, D.J.; THASE, M.E.; MALLINGER, A.G.; SWARTZ, H.; FAGIOLINI, A.M.; GROCHOCINSKI,V.; HOUCK, P.; SCOTT, J.; THOMPSON,W.; MONK, T. Two-year outcomes for interpersonal and social rhythm therapy in individuals with bipolar I disorder. **Arch Gen Psychiatry**. v. 62, n. 9, p. 996-1004, 2005
 74. FREY, B. 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**, v. 31, n. 5, p. 326–32, set. 2006.
 75. GAO, H.M. et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v.81, p.1285–1297, 2002.
 76. GESSA, G.L.; PANI, L.; FADDA, P.; FRATTA, W. Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania Eur. **Neuropsychopharmacol.**, v.5, p.89–93, 1995.
 77. GHOSH, P.K.; HRDINA, P.D.; LING, G.M. Effects of REMS deprivation on striatal dopamine and acetylcholine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.4, p.401–405, 1976.
 78. GERGERLIOGLU, H.S; SAVAS, H.A.; BULBUL, F.; SELEK, S.; UZ, E.; & YUMRU, M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 31, p. 697-702, 2007.
 79. GIOVANOLI, S.; ENGLER, H.; ENGLER,A.; RICETTO, J.; VOGET,M.; Willi, R.; Winter, C.; Riva,M.A.; Mortensen,P.B.; Feldon,J.; Schedlowski,M.;

- Meyer, U.* Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice. 2014
80. GIRONI CARNEVALE, U.A.; VITULLO, E.; SADILE, A.G. Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 39, p.187–195, 1990.
 81. GOLDSTEIN, T.R.; BRIDGE, J.A.; BRENT, D.A. Sleep disturbance preceding completed suicide in adolescents. **Journal of Consulting and Clinical Psychology.**, p.76 n.1, p.84–91, 2008.
 82. GRUBER, J. et al. Sleep functioning in relation to mood, function, and quality of life at entry to the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). **J Affect Disord.**, v. 114, n. 1-3, p.41-9, 2009.
 83. GUZMAN-MARIN, R. et al. Suppression of hippocampal plasticity-related gene expression by sleep deprivation in rats. **The Journal of physiology**, v. 575, n. Pt 3, p. 807–19, 15 set. 2006.
 84. HANSENNE, M. et al. The tridimensional personality questionnaire (TPQ) and depression. **European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 13, n. 2, p. 101–3, 1998.
 85. HASTINGS, M.H.; MAYWOOD, E.S.; REDDY, A.B. Two decades of circadian time. **J. Neuroendocrinol.**, v.20, p.812–819, 2008.
 86. HENNESSY, M. B., HEYBACH, J. P., VERNIKOS J. AND LEVINE S. Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. **Physiology & Behavior**, v.22, p. 821–825, 1979.
 87. HENRY, B.L.; MINASSIAN, A.; YOUNG, J.W.; PAULUS, M.P.; GEYER, M.A. Crossspecies assessments of motor and exploratory behavior related to bipolar disorder. **Neurosci Biobehav.**, v 34, p1296–1306, 2010.
 88. Hirshfeld-Becker, D.R.; Biederman, J.; Calltharp, S.; Rosenbaum, E.D.; Faraone, S.V.; Rosenbaum, J.F. Behavioral inhibition and disinhibition as hypothesized precursors to psychopathology: implications for pediatric bipolar disorder. **Biol Psychiatr.**, v.53, p. 985–99, 2003
 89. HIRSHFELD-BECKER, D.R.; BIEDERMAN, J.; CALLTHARP, S.; ROSENBAUM, E.D.; FARAONE, S.V.; ROSENBAUM, J.F. Behavioral inhibition and disinhibition as hypothesized precursors to psychopathology: implications for pediatric bipolar disorder. **Biol Psychiatr.**, v.53, p.985–99, 2003.
 90. HOLUBOVA, K.; NEKOVAROVA, T.; PISTOVCAKOVA, J.; SULCOVA, A.; STUHLIK, A.; VALES, K. Pregnanolone Glutamate, a Novel Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Properties in Animal Models. **Front Behav Neurosci.**, v. 8, p.130, 2014.

91. HOOD, S. et al. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14046–58, 20 out. 2010.
92. HOOKS, M.S.; JONES, G.H.; SMITH, A.D.; NEILL, D.B.; JUSTICE, JR.JB. Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. **Synapse.**, v.9, p.121–8, 1991.
93. HUGHES, R.N. Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. **Neurosci Biobehav.**, v. 31, p.441-464, 2007.
94. HUSTON, J. P. et al. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, **Pharmacological and neurochemical assessments**. v. 93, n. 1, p. 243–251, 1999.
95. Imeri, L.; Opp, M.R. How(andwhy) the immune system makes us sleep. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.10, p.199–210, 2009.
96. J.W. et al. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. **Nature**, v.480, n.7378, p. 552–6, 2011.
97. JORNADA, L.K.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; MORETTI, M.; MINA, F.; FERREIRA, C.L.; ARENT, C.O.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. **J Psychiatr Res.**, v. 45, n.2, p. 162-8, 2011
98. JABBEN, N. et al. Neurocognitive functioning as intermediary phenotype and predictor of psychosocial functioning across the psychosis continuum: studies in schizophrenia and bipolar disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 6, p. 764–74, jun. 2010.
99. JACKSON, A.; CAVANAGH, J.; SCOTT, J. A systematic review of manic and depressive prodromes. **Journal of Affective Disorders**. v.74, p.209–217, 2003.
100. JANKOWSKI, K. S. The role of temperament in the relationship between morningness-eveningness and mood. **Chronobiology international**, v. 31, n. 1, p. 114–22, fev. 2014.
101. JANOWSKY, D.S.; MORTER, S.; HONG, L.; HOWE, L. Myers Briggs Type Indicator and Tridimensional Personality Questionnaire differences between bipolar patients and unipolar depressed patients. **Bipolar Disord.**, v.1, p.98–108, 999.
102. JIANG, W.G.; LI, S.X.; LIU, J.F.; SUN, Y.; ZHOU, S.J.; ZHU, W.L.; SHI, J.; LU, L. C.L.O.C.K.Hippocampal protein participates in the persistence of

- depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress, **Psychopharmacology**, v.227, n.1, p.79–92, 2013.
103. JUPP, B. et al. Social dominance in rats: effects on cocaine self-administration, novelty reactivity and dopamine receptor binding and content in the striatum. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 4, p. 579–89, fev. 2016.
104. JUSTER, R.P.; MCEWEN, B.S.; LUPIEN, S.J. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 35, n.1, p.2–16, 2010.
105. JORNADA, L.K.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; MORETTI, M.; MINA, F.; FERREIRA, C.L.; ARENT, C.O.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. **J Psychiatr Res.**, v. 45, n.2, p. 162-8, 2011.
106. KABBAJ, M.; DEVINE, D.P.; SAVAGE, V.R.; AKIL, H. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. **J Neurosci.**, v.20, p.6983–8, 2000.
107. KAHL, K.G. et al. Bone mineral density, markers of bone turnover, and cytokines in young women with borderline personality disorder with and without comorbid major depressive disorder. **Am. J. Psychiatry.**, v.162, p.168–174, 2005.
108. KALSBECK, A.; VAN DER SPEK, R.; LEI, J.; ENDERT, E.; BUIJS, R.M.; FLIERS, E. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Mol Cell Endocrinol.**, v.349, n.1, p.20–9, 2012.
109. KAMEDA, S. R. et al. The effects of paradoxical sleep deprivation on amphetamine-induced behavioral sensitization in adult and adolescent mice. **Psychiatry research**, v. 218, n. 3, p. 335–40, 30 ago. 2014.
110. KAMPMAN, O.; POUTANEN, O. Can onset and recovery in depression be predicted by temperament? A systematic review and meta-analysis. **Journal of affective disorders**, v. 135, n. 1–3, p. 20–7, dez. 2011.
111. KAPSIMALIS, F.; RICHARDSON, G.; OPP, M.R.; KRYGER, M. Cytokines and normal sleep. **Curr. Opin. Pulm. Med.** v.11, p.481–484, 2005.
112. KASPER, S.; WEHR, T.A. The role of sleep and wakefulness in the genesis of depression and mania. **Encephale**, v. 18, p. 45–50, 1992.
113. KATZ, G.; DURST, R.; ZISLIN, Y.; BAREL, Y.; KNOBLER, H.Y. Psychiatric aspects of jet lag: review and hypothesis. **Med Hypotheses**, v.56, n.1, p.20–3, 2001.

114. KATZ, R. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.16, p.965–8, 1982.
115. KAUER-SANT'ANNA, M; KAPCZINSKI, F; ANDREAZZA, A.C; BOND, D.J; LAM, R.W; YOUNG, L.T. et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 12, n. 4, p. 447– 58, 2009.
116. KAZLAUCKAS, V. et al. Behavioral and cognitive profile of mice with high and low exploratory phenotypes. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 2, p. 272–8, 30 jul. 2005a.
117. KAZLAUCKAS, V. et al. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. **Physiology & behavior**, v. 102, n. 5, p. 475–80, 28 mar. 2011b.
118. KAZLAUCKAS, V.; KALININE, E.; LEKE, R.; OSES, J.P.; NUNES, F.; ESPINOSA, J.; MIORANZZA, S.; LULHIER, F.; PORTELA, L.V.; PORCIÚNCULA, L.O.; LARA, D.R. Distinctive effects of unpredictable subchronic stress on memory, serum corticosterone and hippocampal BDNF levels in high and low exploratory mice. **Behav Brain Res.**, v. 218, n.80-86, 2011c.
119. KAZLAUCKAS, V.; PAGNUSSAT, N.; MIORANZZA, S.; KALININE, E; NUNES, F.; PETTENUZZO, L.; SOUZA, D.O.; PORTELA, L.V.; PORCIÚNCULA, L.O.; LARA, D.R. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. **Physiol Behav.**, v.102, p.475-480, 2011d.
120. KERMAN, I. A. et al. Inborn differences in environmental reactivity predict divergent diurnal behavioral, endocrine, and gene expression rhythms. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 2, p. 256–269, 2012.
121. KHADRAWY, Y. A.; NOUR, N. A.; ABOUL EZZ, H. S. Effect of oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation on the activities of Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in the cortex and hippocampus of rat. Translational research: **the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 157, n. 2, p. 100–7, fev. 2011.
122. KIESSLING, S.; EICHELE, G.; OSTER, H. Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. **J Clin Invest.**, v. 120, n.7, p.2600–9, 2010.
123. KIM, E.Y.; MAHMOUD, G.S.; GROVER, L.M. REM sleep deprivation inhibits LTP in vivo in area CA1 of rat hippocampus. **Neurosci Lett.**, v. 388, p. 163–167, 2005.

- 124.KIM, Y.; LAPOSKY, A.D.; BERGMANN, B.M.; TUREK, F.W. Repeated sleep restriction in rats leads to homeostatic and allostatic responses during recovery sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p.10697–10702, 2007.
- 125.KIM, Y.K; JUNG, H.G; MYINT, A.M; KIM, H; PARK, S.H. Imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *Journal of affective disorders.*, v.104, n.1-3, p. 91–5, 2007.
- 126.KINO, T.; CHROUSOS, G.P. Glucocorticoid effect on gene expression. In *Handbook on Stress and the Brain* (Steckler, T. et al.,eds), pp. 295–312, Elsevier BV(2005)
- 127.KINO, T.; CHROUSOS, G.P. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. *Essays Biochem.*, v.40, p.137–155, 2004.
- 128.KONRADI, C. et al. Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Archives of general psychiatry*, v. 61, n. 3, p. 300–8, mar. 2004.
- 129.KREUTZMANN, J. C. et al. Sleep deprivation and hippocampal vulnerability: changes in neuronal plasticity, neurogenesis and cognitive function. *Neuroscience*, v. 309, p. 173–190, 2015.
- 130.LAMIA, K.A.; PAPP, S.J.; YU, R.T.; BARISH, G.D.; UHLENHAUT, N.H.; JONKER, J.W.; DOWNES , M.; EVANS, R.M. Cryptochromes mediate rhythmic repression of theglucocorticoid receptor, *Nature.*, v.480, n7378, p.552–556 ,2011.
- 131.LAMONT, E. W. et al. The role of circadian clock genes in mental disorders. *Dialogues in clinical neuroscience*, v. 9, n. 3, p. 333–42, 2007.
- 132.LANDGRAF ,D.; MCCARTHY, M.J.;WELSH, D.K. Clock in Animal Models of Mood Disorders. *Behav Neurosci*, 2014.
- 133.LANDGRAF, D. et al. The mood stabilizer valproic acid opposes the effects of dopamine on circadian rhythms. *Neuropharmacology*, v. 107, p. 262–270, 2016
- 134.LANDGRAF, D.; MCCARTHY, M.J.; WELSH, D.K. The Role of the Circadian Clock in Animal Models of Mood Disorders. *Behav Neurosci.*, 2014.
- 135.LANDGRAF, D.; MCCARTHY, M.J.; WELSH, D.K. Circadian Clock and Stress Interactions in the Molecular Biology of Psychiatric Disorders *Curr Psychiatry Rep.*, v.16, n 483, 2014.
- 136.LANQUILLON, S. et al. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology.*, v.22, p.370–379, 2000.
- 137.LE MINH, N.; DAMIOLA, F.; TRONCHE, F.; SCHUTZ, G.; SCHIBLER, U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.*, v.20, p.24, p.7128–36, 2001.

- 138.LECOCQ, F.R.; MEBANE, D.; MADISON, L.L. The Acute Effect of Hydrocortisone on Hepatic Glucose Output and Peripheral Glucose Utilization. **J Clin Invest.**, v.43, p.237–46, 1964.
- 139.LELIAVSKI, A.; SHOSTAK, A.; HUSSE, J.; OSTER, H. Impaired glucocorticoid production and response to stress in Arntl-deficient male mice.**Endocrinology.**, v.155, n.1, p.133–42, 2014.
- 140.LE-NICULESCU, H. et al. Phenomic, convergent functional genomic, and biomarker studies in a stress-reactive genetic animal model of bipolar disorder and co-morbid alcoholism. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 147, n. 2, p. 134–166, 2008.
- 141.LEPROULT, R.; COPINSCHI, G.; BUXTON, O. *et al.* Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. **Sleep.**, v. 20, p. 865–870, 1997.
- 142.LIM, M. M. et al. Sleep deprivation differentially affects dopamine receptor subtypes in mouse striatum. **Neuroreport**, v. 22, n. 10, p. 489–93, 13 jul. 2011.
- 143.LIMA, A. M. A.; DE BRUIN, V. M. S.; RIOS, E. R. V.; DE BRUIM, P. F. C.. Differential effects of paradoxical sleep deprivation on memory and oxidative stress Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. , v. 387, p. 399–406, 2014.
- 144.LIU, C.; REPERT, S.M. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. **Neuron**.v.25, n1, p.123–8, 2000.
- 145.LIU, J. et al. The circadian clock Period 2 gene regulates ginterferon production of NK cells in host response to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. **Infect. Immun.** v.74, p.4750–4756, 2006.
- 146.LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacogn Rev.**, v.4, n.8, p.118–126, 2010.
- 147.LOGAN, R.W.; EDGAR, N.; GILLMAN, A.G.; HOFFMAN, D.; ZHU, X.; MCCLUNG, C.A. Chronicstress induces brain region-specific alterations of molecular rhythms thatcorrelate with depression-like behavior in mice, **Biol. Psychiatry.**, v.78, n.4, p.249–258, 2015.
- 148.M. BERK, S.; DODD, M.; KAUER-SANT'ANNA, G.S.; MALHI, M.; BOURIN, F.; KAPCZINSKI, T.; NORMAN. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. **Acta Psychiatr. Scand. Suppl.**, v.434, p. 41–49, 2007.
- 149.MACÊDO, D. S.; LUCENA, D.F. ; QUEIROZ, A. I. G. ; CORDEIRO, R. C.; ARAUJO, M.M.; SOUSA, F.C. ; VASCONCELOS, S.M.; HYPHANTIS, T. N.; QUEVEDO, J.; Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by 2 MCLNTYRE, R. S.; CARVALHO, A. F. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** ., p.8, 2013.

- 150.MADRIGAL, J.L. et al. The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. **Neuropsychopharmacology.**, v.26, p.155–163, 2002.
- 151.MAJDE, J.A.; KRUEGER, J.M. Links between the innate immune system and sleep. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.116, p.1188–1198, 2005.
- 152.MANIAM, J; ANTONIADIS, C; MORRIS,M.J. Early-Life Stress, HPA Axis. Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Front **Endocrinol.**, v.5, n. 73, 2014.
- 153.MANSOUR, H. A. et al. Association study of 21 circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia. **Bipolar disorders**, v. 11, n. 7, p. 701–10, nov. 2009.
- 154.MAREMMANI, I.; AKISKAL, H.S.; SIGNORETTA, S.; LIGUORI, A.; PERUGI, G.; CLONINGER, R. The relationship of Kraepelian affective temperaments (as measured by TEMPS-I) to the tridimensional personality questionnaire (TPQ). **J Affect Disord.**, v.85, p.17–27, 2005.
- 155.MCCARTHY, M. J. et al. Disinhibition of the extracellular-signal-regulated kinase restores the amplification of circadian rhythms by lithium in cells from bipolar disorder patients. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, p. 1–10, 2016.
- 156.MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. **N Engl J Med.**, v.338, p.171–179, 1998.
- 157.MCEWEN, B.S. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. **Metabolism.**, v.55: p.20–23, 2006a.
- 158.MCEWEN, B.S.; CHATTARJI, S. Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. **Neuropsychopharm.**, v.14, p. S497–S502 , 2004.
- 159.MCEWEN, B.S. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. **Metabolism.** V.55, Sup.,p.S20–S23, 2006b.
- 160.MEERLO, P.; OVERKAMP, G.J.F.; BENNING, M.A. *et al.* Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. **Physiol Behav.**, v. 60, p. 115–119, 1996.
- 161.MONGRAIN, V. et al. Sleep loss reduces the dna-binding of bmal1, clock, and npas2 to specific clock genes in the mouse cerebral cortex. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

162. MONTELEONE, P.; MAJ, M. The circadian basis of mood disorders: recent developments and treatment implications. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 18, n. 10, p. 701–11, out. 2008.
163. MULLINGTON, J.M.; CHAN, J.L.; VAN DONGEN, H.P. *et al.* Sleep loss reduces diurnal rhythm amplitude of leptin in healthy men. *J. Neuroendocrinol.*, v.15, p.851–854, 2003.
164. MIYAZAKI, I.; & ASANUMA, M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama.*, v. 62, p. 141-150, 2008.
165. MUSTY, R.E.; CONSROE, P.F. Phencyclidine produces aggressive behavior in rapid eye movement sleep-deprived rats. *Life Sci.*, v.30, p. 1733–1738, 1982.
166. NADER, N.; CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab TEM.*, v.21, n.5, p.277–86, 2010.
167. NADJAR, A., BLUTHÉ, R.M.; MAY, M.J.; DANTZER, R.; PARNET, P. Inactivation of the cerebral NFκB pathway inhibits interleukin-1β-induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. *Neuropsychopharmacology . Neuropsychopharmacology.*, v.30, n.8, p.1492-9, 2005.
168. NIEVERGELT, C. M. *et al.* Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, v. 141B, n. 3, p. 234–41, 5 abr. 2006.
169. O'BRIEN, S.M.; SCULLY, P; SCOTT, L.V; DINAN, T.G. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *Journal of affective disorders.*, v. 90, n.2-3, p. 263–7, 2006.
170. O'CONNOR, K.A. *et al.* Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. *Brain Res.* v.991, p.123–132, 2003.
171. OKAMURA, H. *et al.* Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science (New York, N.Y.)*, v. 286, n. 5449, p. 2531–4, 24 dez. 1999.
172. ORTIZ-DOMÍNGUEZ, A; HERNÁNDEZ, M.E; BERLANGA, C; GUTIÉRREZ-MORA, D; MORENO, J; HEINZE, G. *et al.* Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar disorders.*, v.9, n.6, p.596–602, 2007.
173. OSTER, H.; DAMEROW, S.; KIESSLING, S.; JAKUBCAKOVA, V.; ABRAHAM, D.; TIAN, J.; *et al.* The circadian rhythm of glucocorticoids is

- regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. **Cell Metab.**, v.4, n.2, p.163–73, 2006.
174. OTTONI, G. L.; ANTONIOLLI, E.; LARA, D. R. Circadian preference is associated with emotional and affective temperaments. **Chronobiology international**, v. 29, n. 6, p. 786–93, jul. 2012.
175. PAPIOL, S.; ROSA, A.; GUTIERREZ, B. et al. Interleukin-1 cluster is associated with genetic risk for schizophrenia and bipolar disorder. **J Med Genet.** v. 41, p. 219–23, 2004.
176. PARNAUDEAU, S.; DONGELMANS, M.L.; TURIAULT, M.; AMBROGGI, F.; DELBES, A.S.; CANSELL, C.; et al. Glucocorticoid receptor gene inactivation in dopamine-innervated areas selectively decreases behavioral responses to amphetamine. **Front Behav Neurosci.**, v. 8, p.35, 2014.
177. PAWLAK, J. et al. Personality traits as an endophenotype in genetic studies on suicidality in bipolar disorder. **Acta neuropsychiatrica**, p. 1–7, 30 ago. 2016.
178. PECKETT, A.J.; WRIGHT, D.C.; RIDDELL, M.C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metab Clin Exp.**, v.60, n.11, p.1500–10, 2011.
179. PELLOUX, Y.; COSTENTIN, J.; DUTERTE-BOUCHER, D. Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 84, p.43-50, 2006.
180. PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods.** v.14:149–167, 1985.
181. PETROVSKY, N. Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. **Immunol. Cell Biol.**, v.79, p.350–357, 2001.
182. POLLMACHER, T.; SCHULD, A.; KRAUS, T. et al. Experimental immunomodulation, sleep, and sleepiness in humans. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.917, p.488–499, 2000.
183. PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; & LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 315-424, 2007.
184. PALMEIRA, C.M.; SANTOS, M.S.; CARVALHO, A.P.; & OLIVEIRA, C.R. Membrane lipid peroxidation induces changes in gamma-[3H]aminobutyric acid transport and calcium uptake by synaptosomes. **Brain Res.**, v. 609, p. 117-123, 1993.
185. PICKERING, M.; O’CONNOR, J.J. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. **Prog Brain Res.**, v. 163, p. 339–54, 2007.

- 186.PLEIN, H.; & BERK, M. The platelet as a peripheral marker in psychiatric illness. **Hum Psychopharmacol.**, v. 16: 229-236, 2001.
- 187.QUEIROZ, A. I. G.; ARAÚJO, M.M.; ARAÚJO, T. S.; Souza, G. C.; CAVALCANTE, L. M.; MACHADO, M. J. S.; LUCENA, D. F.; QUEVEDO, J. ; Macêdo, D. S. GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs **Metab Brain Dis.**, v.30, p. 1207–1215, 2015.
- 188.RAISON, C.L.; MILLER, A.H. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. **Am. J. Psychiatry.**, v.160, p.1554–1565, 2003.
- 189.RAMANATHAN, L.; HU, S.; FRAUTSCHY, S.A.; SIEGEL, J.M. Short-term total sleep deprivation in the rat increases antioxidant responses in multiple brain regions without impairing spontaneous alternation behavior. **Behav Brain Res** ,v.207, n.2, p. 305–309, 2010.
- 190.REDDY, T.E.; PAULI, F.; SPROUSE, R.O.; NEFF, N.F.; NEWBERRY, K.M. Garabedian MJ, et al. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. **Genome Res.**, v.19, v.12, p.2163–71, 2009.
- 191.REDOLAT, R.; PÉREZ-MARTÍNEZ, A.; CARRASCO, M.C.; MESA, P. Individual differences in novelty-seeking and behavioral responses to nicotine: a review of animal studies. **Curr Drug Abuse**, v. 2, p.230-242, 2009.
- 192.REES, J.N.; FLORANG, V.R.; ANDERSON, D.G.; DOORN, J.A.Lipid peroxidation products inhibit dopamine catabolism yielding aberrant levels of a reactive intermediate. **Chem. Res. Toxicol.**, v.20, p. 1536–1542, 2007.
- 193.RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. **N. Engl. J. Med.**, v.353, p.1711–1723, 2005.
- 194.RICHTER, J.; EISEMANN, M.; RICHTER, G. Temperament and character during the course of unipolar depression among in patients. **Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci.**, v.250, n. 40–7, 2000.
- 195.ROBILLARD, R. et al. Sleep-wake cycle and melatonin rhythms in adolescents and young adults with mood disorders: comparison of unipolar and bipolar phenotypes. **European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 28, n. 7, p. 412–6, set. 2013.
- 196.ROBILLARD, R.; NAISMITH, S. L.; HICKIE, I. B. Recent advances in sleep-wake cycle and biological rhythms in bipolar disorder. **Current psychiatry reports**, v. 15, p. 402, 2013.

- 197.ROSARIO, L.A.; ABERCROMBIE, E.D. Individual differences in behavioral reactivity: correlation with stress-induced norepinephrine efflux in the hippocampus of Sprague–Dawley rats. **Brain Res Bull.**, v.48, p.95–602, 1999.
- 198.ROSENBERG, R.; DOGHRAMJI, P.P. Is shift work making your patient sick? Emerging theories and therapies for treating shift work disorder. **Postgrad Med.**, v.123, n. 5, p.106–15, 2011.
- 199.ROSENBERG, R.; DOGHRAMJI, P.P. Is shift work making your patient sick? merging theories and therapies for treating shift work disorder. **Postgrad Med.**, v.123, n.5, p.106–15, 2011.
- 200.ROUGE PONT, F.; PIAZZA, P.V.; KHAROUBY, M.; LE MOAL, M.; SIMON, H. Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. **Brain Res.**, v.602, p.169–174, 1993.
- 201.ROYBAL, K. et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 15, p. 6406–11, 10 abr. 2007.
- 202.RYBAKOWSKI, J. K. et al. Polymorphism of circadian clock genes and temperamental dimensions of the TEMPS-A in bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 159, p. 80–84, 2014.
- 203.RAO, J.S.; HARRY, G.J.; RAPOPORT, S.I. et al. Increased excitotoxicity and neuroinflammatory markers in postmortem frontal cortex from bipolar disorder patients. **Mol Psychiatry.**, v. 15, p. 384–92, 2010.
- 204.SADILE, A. G.. Long-term habituation of θ -related activity components of albino rats in the Låt-maze. **Motor Activity and Movement Disorders**. Humana Press, p. 3-55, 1996.
- 205.SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Arch Gen Psychiatry.**, v.57, n.10, p.925–35, 2000.
- 206.SARKAR, A.; BHADURI, A. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 284, n.1, p. 73-8, 2001.
- 207.SAVAS, H.A.; GERGERLIOGLU, H.S.; ARMUTCU, F.; HERKEN, H.; YILMAZ, H.R.; KOCOGLU, E.; SELEK, S.; TUTKUN, H.; ZOROGLU, S.S.; & AKYOL, O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. **World J Biol Psychiatry.**, v. 7, p. 51-55, 2006.
- 208.SELEK, S.; SAVAS, H.A.; GERGERLIOGLU, H.S.; BULBUL, F.; UZ E, & YUMRU .M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during

- treatment of bipolar depressive episode. **J Affect Disord.**, v. 107, p. 89-94, 2008.
- 209.SHAO L; YOUNG, L.T.; & WANG, J.F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. **Biol Psychiatry.**, v. 58, p. 879-884, 2005.
- 210.SÖDERLUND, J.; OLSSON, S.K.; SAMUELSSON, M.; WALTHER-JALLOW, L.; JOHANSSON, C.; ERHARDT, S.; ENGBERG, G. Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 β in bipolar disorder. **Journal of Psychiatry & Neuroscience .JPN.**, v. 36, n.2, p. 114–118, 2011.
- 211.SCHLATTER, J. et al. Monocytic parameters in patients with dysthymia versus major depression. **J. Affect. Disord.**, v.78, p.243–247, 2004.
- 212.SELEEM, M. A. et al. The longitudinal course of sleep timing and circadian preferences in adults with bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 17, n. 4, p. 392–402, jun. 2015.
- 213.SERRETTI, A. et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 121B, n. 1, p. 35–8, 15 ago. 2003.
- 214.SERRETTI, A. et al. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 137B, n. 1, p. 36–9, 5 ago. 2005.
- 215.SHI, H.S.; LUO, Y.X.; XUE, Y.X.; WU, P.; ZHUWL, DING, Z.B. et al. Effects of sleep deprivation on retrieval and reconsolidation of morphine reward memory in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.98, n.2, p.299–303, 2011.
- 216.SILVA, R.H.; ABILIO, V.C.; TAKATSU, A.L. *et al.* Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology.**, v.46, p. 895–903, 2004.
- 217.SILVA, R.H.; ABILIO, V.C.; TAKATSU, A.L.; KAMEDA, S.R.; GRASSL, C.; CHEHIN, A.B. et al Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology.**, v.46, n.6, p.895–903, 2004.
- 218.SILVA, R.H.; ABÍLIO, V.C.; TAKATSU, A.L.; KAMEDA, S.R.; GRASSL, C.; CHEHIN, A.B.; MEDRANO, W.A.; CALZAVARA, M.B.; REGISTRO, S.; ANDERSEN, M.L.; MACHADO, R.B.; CARVALHO, R.C.; RIBEIRO, R.A.; TUFIK, S.; FRUSSA-FILHO, R. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology.**, v.46, n.6, p.895–903, 2004.

- 219.SILVERMAN, M.N. et al. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. **Viral Immunol.**, v.18, p.41–78, 2005.
- 220.Short term total sleep deprivation in the rat increases antioxidant responses in multiple brain regions without impairing spontaneous alternation behavior. **Behav Brain Res.**, v.207, n.2, p.305–309, 2010.
- 221.McEwen, B. S. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load. **Metabolism Clinical and Experimental.**, v.55, p.S20–S23, 2006.
- 222.SLUYTER, F.; KORTE, S.M.; BOHUS, B.; VAN OORTMERSSSEN, G.A. Behavioral. stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. **Pharmacol Biochem Behav**, v.54, p.113–6, 1996.
- 223.SLUZEWSKA, A. et al. Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.762, p.474–476, 1995.
- 224.SMITH, M. J. et al. Temperament and character as schizophrenia-related endophenotypes in non-psychotic siblings. **Schizophrenia research**, v. 104, n. 1–3, p. 198–205, set. 2008.
- 225.SMOLLER, J.W.; FINN, C.T. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. **Am J Med Genet.**, v.123C, p.48–58, 2003.
- 226.SO, A.Y.; BERNAL, T.U.; PILLSBURY, M.L.; YAMAMOTO, K.R.; FELDMAN, B.J. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucosehomeostasis, **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, v.106, n.41, p.17582–17587, 2009.
- 227.SOUZA, L.C.; WILHELM, E.A.; BORTOLATTO, C.F.; NOGUEIRA, C.W.; BOEIRA, S.P.; JESSE, C.R. The protective effect of melatonin against brain oxidative stress and hyperlocomotion in a rat model of mania induced by ouabain. **Behav. Brain Res.**, v.271, p.316–324, 2014.
- 228.SPANAGEL, R.; PENDYALA, G.; ABARCA, C.; ZGHOUL, T.; SANCHIS-SEGURA, C.; MAGNONE, M.C, et al. The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. **Nat Med.**, v.11, n.1, p.35–42, 2005.
- 229.SPEAR, L. P. Heightened stress responsivity and emotional reactivity during pubertal maturation: Implications for psychopathology. **Dev. Psychopathol.**, v. 21, n. 87, 2009.
- 230.SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v. 24, p. 417, 2000

- 231.SPIEGEL, K.; LEPROULT, R.;VAN CAUTER E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. **Lancet.**, v.354, p. 1435–1439, 1999.
- 232.SPIEGEL, K.; TASALI, E.; PENEV, P. *et al.* Brief communication: sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. **Ann Intern Med.**, v.141, p. 846–850, 2004.
- 233.STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Inter-individual vs line/strain differences psychogenetically selected Roman High (RHA) and Low (RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioral aspects. **Neurosci Behav Rev.**, v.29, p. 99–112, 2005.
- 234.STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P. E. Scopolamine- and morphineinduced impairments of spontaneous alteration performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. **Behav. Neurosci.**, v. 105, p. 264–271, 1991.
- 235.STRECK, E. L. et al. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. **Neurochemical research**, v. 40, n. 6, p. 1144–52, jun. 2015.
- 236.STRECK, E.L.;SCAINI, G.; JEREMIAS, G.C.; REZIN, G.T.; GONÇALVES, C.L.; FERREIRA, G.K.; RÉUS, G.Z.; RESENDE, W.R.; VALVASSORI, S.S.; KAPCZINSKI, F.; ANDERSEN, M.L.; QUEVEDO, J. Effects of mood stabilizers on brain energy metabolism in mice submitted to an animal model of mania induced by paradoxical sleep deprivation **Neurochem. Res.**, v.40, n.6, p.1144–1152, 2015.
- 237.SUER, C.; DOLU, N.; ARTIS, A.S.; SAHIN, L.;YILMAZ, A.; CETINA. The effects of suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity.**Nature.**, v.387, n 6633, p. 598–603, 1997.
- 238.SUER C, DOLU N, ARTIS AS, SAHIN L,YILMAZ A, CETINA. The effects of long-term sleep deprivation on the long-term potentiation in the dentate gyrus and brain oxidation status in rats. **Neurosci Res.**, v.70, n.1, p.71–77, 2011.
- 239.SVRAKIC, D. M. et al. Differential diagnosis of personality disorders by the seven-factor model of temperament and character. **Archives of general psychiatry**, v. 50, n. 12, p. 991–9, dez. 1993.
- 240.TAGHZOUTI, K.; LAMARQUE, S.; KHAROUBY, M.; SIMON, H. Interindividual differences in active and passive behaviors in the forced-swimming test: implications for animal models of psychopathology—an overview. **Biol psychiatry.**, v.45, p.750–8, 1999.

- 241.TAISHI, P; CHEN, Z; OBAL JR, F. *et al.* Sleep-associated changes in interleukin-1 mRNA in the brain. **J Interferon Cytokine Res.**, v.18, p. 793–798, 1998.
- 242.RICHTER, J.; EISEMANN, M.; RICHTER, G. Temperament and character during the course of unipolar depression among in patients. **Eur Arch Psychiatr Clin Neurosci.**, v.250, p.40–7, 2000.
- 243.THIEL, C.M.; MULLER, C.P.; HUSTON, J.P. and R. K.W. schwarting high versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience.**, v.93, n. 1, p. 243–251, 1999.
- 244.TOTH, L.A. Sleep, sleep deprivation and infectious disease: studies in animals. **Adv. Neuroimmunol.**, v.5, p.79–92, 1995.
- 245.TSUCHIMINE, S. et al. The CLOCK C3111T polymorphism is associated with reward dependence in healthy Japanese subjects. **Neuropsychobiology**, v. 67, n. 1, p. 1–5, 2013.
- 246.TUREK, F.W. From circadian rhythms to clock genes in depression, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, v.22, p.S1–S8, 2007.
- 247.UZ, T.; AHMED, R.; AKHISAROGLU, M.; KURTUNCU, M.; IMBESI, M.; DIRIM ARSLAN, A.; MANEV, H. Effect of fluoxetine and cocaine on the expression of clock genes in themouse hippocampus and striatum, **Neuroscience.**, v.134, n.4, p.1309–1316, 2005.
- 248.VAN ENKHUIZEN, J. et al. The catecholaminergic-cholinergic balance hypothesis of bipolar disorder revisited. **European journal of pharmacology**, v. 753, p. 1–13, 2014.
- 249.VEENEMA, A.H.; MEIJER, O.C.; DE KLOET ER.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS, B.G. Differences in basal and stress-induced HPA regulation of wild house mice selected for high and low aggression. **Horm Behav.**, v.43, p.197–204, 2003.
- 250.VOLLERT, C.; ZAGAAR, M.; HOVATTA, I.; TANEJA, M.; VU, A.; DAO, A et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behav Brain Res.**,v. 224, n.2, p.233–240, 2011.
- 251.VIVIANI, B.; GARDONI, F.; MARINOVICH, M. Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. **Int Rev Neurobiol.** 2007;82:247–6
- 252.VOLTERRA, A.; TROTTI D, & RACAGNI, G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. **Mol Pharmacol.**, v. 46, p. 986-992, 1994.

253. WAGNER, S.; CASTEL, M.; GAINER, H.; YAROM, Y. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. **Nature**, v.387, n.6633, p.598–603, 1997.
254. WANG, X. et al. Interleukin-1 alpha-induced activation of p38 mitogen-activated kinase inhibits glucocorticoid receptor function. **Mol. Psychiatry**, v.9, p.65–75, 2004.
255. WELKER, W.J. Escape, exploratory, and food-seeking responses of rats in a novel situation. **J. comp. Physiol. Psychol.**, v.52, p.106–111, 1959.
256. WEST, A.P. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr.**, v.14, p.863–77, 1990.
257. GIOVANOLI, S., ENGLER, H., ENGLER, A., RICETTO, J., VOGET, M., WILLI, R., WINTER, C., RIVA, M.A., MORTENSEN, P.B., FELDON, J., SCHEDLOWSKI, M., MEYER, U. Stress in Puberty Unmasks Latent Neuropathological Consequences of Prenatal Immune Activation in Mice. **SCIENCE**, V. 339, p. 1095-99, 2014.
258. WISOR, J. P. et al. A role for cryptochromes in sleep regulation. **BMC neuroscience**, v. 3, p. 20, 20 dez. 2002.
259. WISOR, J. P. et al. Sleep deprivation effects on circadian clock gene expression in the cerebral cortex parallel electroencephalographic differences among mouse strains. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 28, p. 7193–201, 9 jul. 2008.
260. WOOD, G.E.; YOUNG, L.T.; REAGAN, L.P. *et al.* Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. **Horm. Behav.**, v. 43, p. 205–213, 2003.
261. WU, J.C.; BUNNEY, W.E. The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v.147, p.14–21, 1990.
262. WULFF, K.; GATTI, S.; WETTSTEIN, J.G.; FOSTER R.G. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurosci.**, v.11, n.8, p. 589–99, 2010.
263. YAN, J.; WANG, H.; LIU, Y.; SHAO, C. Analysis of gene regulatory networks in the mammalian circadian rhythm. **PLoS Comput Biol.**, v.4, n.10, p.1000-193, 2008.
264. YANIC, M.; VURAL, H.; & Akyol, O. The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.**, v. 254, p. 43-47, 2004.

265. YANG, R.-H. et al. Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus. **Brain research**, v. 1230, p. 224–32, 16 set. 2008.
266. YOSHIMI, N. et al. Cerebrospinal fluid metabolomics identifies a key role of isocitrate dehydrogenase in bipolar disorder: evidence in support of mitochondrial dysfunction hypothesis. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 11, p. 1504–1510, nov. 2016.
267. YOUNG, J. W. et al. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: Mimicking quantitative assessment of manic behavior. **Psychopharmacology**, v. 208, p. 443–454, 2010.
268. YOUNG, J. W.; KOOISTRA, K.; GEYER, M. A. Dopamine receptor mediation of the exploratory/hyperactivity effects of modafinil. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1385–96, 2011.
269. YOUNG, L.T.; BAGBY, R.M.; COOKE, R.G.; PARKER, J.D.; LEVITT, A.J.; JOFFE, R.T. A comparison of Tridimensional Personality Questionnaire dimensions in bipolar disorder and unipolar depression. **Psychiatr Res.**, v.58, p.139–43, 1995.
270. YOUNGBLOOD, B.D.; ZHOU, J.; SMAGIN, G.N. *et al.* Sleep deprivation by the “flower pot” technique and spatial reference memory. **Physiol Behav.**, v.61, p.249–256,1997.
271. ZANINOTTO, L. et al. Temperament and character profiles in bipolar I, bipolar II and major depressive disorder: Impact over illness course, comorbidity pattern and psychopathological features of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 184, p. 51–59, 2015.
272. ZANT, J. C. et al. Increases in extracellular serotonin and dopamine metabolite levels in the basal forebrain during sleep deprivation. **Brain research**, v. 1399, p. 40–8, 5, 2011.
273. ZHANG, J.; ABDALLAH, C.G.; CHEN, Y.; HUANG, T.; HUANG. Q.; XU, C.; et al. Behavioral deficits, abnormal corticosterone, and reduced prefrontal metabolites of adolescent rats subject to early life stress. **Neurosci Lett.**, v.545, n.132–7, 2013.
274. ZHU, C.B. et al. p38 MAPK activation elevates serotonin transport activity via a trafficking-independent, protein phosphatase 2A-dependent process. **J. Biol. Chem.** v.280, p.15649—15658, 2005.