

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

ELLYDA FERNANDA LOPES COSTA

**EFEITO DO LÍTIO NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO SIMILAR À
MANIA INDUZIDO POR VARIAÇÕES DE FOTOPERÍODO**

MACEIÓ-AL

2021

ELLYDA FERNANDA LOPES COSTA

**EFEITO DO LÍTIO NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO SIMILAR À
MANIA INDUZIDO POR VARIAÇÕES DE FOTOPERÍODO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade.

Maceió - AL

2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

C837e Costa, Ellyda Fernanda Lopes.

Efeito do lítio na modulação de comportamento similar à mania induzido por variações de fotoperíodo / Ellyda Fernanda Lopes Costa. – 2021.
53 f. : il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió.

Bibliografia: f. 45-52.

Anexos: f. 53.

1. Transtorno bipolar. 2. Suicídio. 3. Fotoperíodo. 4. Lítio. 5. Ritmo circadiano.
I. Título.

CDU: 616.895



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

ELLYDA FERNANDA LOPES COSTA

EFEITO DO LÍTIO NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTO SIMILAR À MANIA
INDUZIDO POR VARIAÇÕES DE FOTOPERÍODO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 30 de novembro de 2021.

Banca Examinadora


Prof. Dr. TIAGO GOMES DE ANDRADE (ORIENTADOR)


Prof. Dr. OLAGIDE WAGNER DE CASTRO

Prof. Dr. GEISON SOUZA IZÍDIO



Documento assinado digitalmente

Geison de Souza Izidio

Data: 06/12/2021 09:27:04-0300

CPF: 032.394.399-30

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais Edenilda e Carlos por sempre me proporcionarem o melhor e por me incentivar a sempre buscar meus objetivos. Por todo amor, por todo cuidado e apoio, por serem a minha base. Aos meus familiares, professores e amigos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela dádiva da vida, por ter me dado força e saúde para superar as dificuldades;

Agradeço aos meus pais Carlos Costa e Edenilda Costa, e minha irmã Érika Costa por todo amor, apoio, por sempre ser meu alicerce, e nunca deixarem os obstáculos da vida me entristecer e fazer desistir, transformando minhas lágrimas em sorrisos.

Ao meu noivo Joel Carvalho, que sempre esteve presente nessa caminhada, que sempre foi meu refúgio e me apoiou em todos os momentos, fazendo essa caminhada ser mais leve. Obrigada por me incentivar, preocupar-se e encorajar-me na busca do meu melhor.

Aos meus avós Manoel Lopes e Jazon Costa (*In Memoria*), minhas avós Edileuza Lopes e Socorro Costa pelo apoio, força e amor dedicado.

À Universidade Federal de Alagoas por ter me proporcionado minha formação. A todos os professores do PPG em Ciências da Saúde, por todos os ensinamentos e colaboração na minha formação;

Agradeço à Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, pela dedicação e orientação que foram a base para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todos esses anos de ensinamentos que enriqueceram não só este trabalho, mas toda a minha vida acadêmica.

Aos colegas do Centro de Medicina Circadiana, em especial Mayara Rodrigues e Luiz Araújo, que além de parceiros de pesquisa, se tornaram meus companheiros de vida, sempre me incentivando, aconselhando e ajudando em tudo. Ao Daniel Coimbra e Vinicius Pinto pela colaboração e contribuições para melhoria do trabalho;

Ao Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFI), Laboratório de Neurofisiologia e Farmacologia Integrativa (LNFI), Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) e ao Biotério Central (BIOCEN) da UFAL, por toda a colaboração e parceria;

Agradeço a banca avaliadora pela disponibilidade e contribuições realizadas para enriquecimento deste trabalho;

Agradeço a CAPES e CNPq por proporcionar-me financiamento enquanto bolsista ao longo do mestrado e pelo financiamento da pesquisa.

À todos os servidores da UFAL, que direta ou indiretamente ajudaram e foram de extrema importância para a realização do trabalho;

Agradeço a todos meus amigos, em especial minhas amigas Sirlâny Oliveira e Denise Macêdo pelo apoio e força; Lúcia Rocha, minha colega de apartamento que sempre esteve presente nos meus dias.

A meus familiares mais próximos que acompanharam minha jornada para chegar até aqui. A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste, o meu muito obrigada.

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno do humor crônico que afeta aproximadamente 2 a 3% da população global. A mania é uma característica fundamental do TB e é caracterizada por sintomas como impulsividade e hiperatividade. Estudos epidemiológicos mostram maior ocorrência de internações por episódios maníacos em períodos de aumentos acentuados da duração da fotofase em um dia, ou fotoperíodo. De forma consistente, estudos prévios realizados por nosso grupo indicam que um aumento gradual do fotoperíodo está associado a um comportamento semelhante à mania em camundongos C57BL/6. Uma hipótese para explicar esse efeito é que variações graduais no fotoperíodo modulam os ritmos circadianos em regiões do cérebro associadas aos transtornos de humor. O lítio (Li) é um estabilizador de humor usado no tratamento de TB com propriedades antimaniacas e antidepressivas. Além disso, o tratamento com Li modula o comportamento relacionado ao humor em roedores. O objetivo deste trabalho é validar o modelo animal do tipo mania induzida por mudanças fotoperiódicas utilizando testes farmacológicos com lítio. Os animais utilizados no presente estudo foram camundongos machos C57BL/6J, distribuídos em três grupos: (1) EP (*Equatorial Photoperiod*), (2) TP (*Transitional Photoperiod*) e (3) TP-Li. Os animais do grupo EP foram expostos a um regime de Claro/Escuro (CE) 12h:12h. O grupo TP foi composto por camundongos expostos a um regime de variações fotoperiódicas graduais (30min no início e 30min no final da fase de luz / dia) partindo de 08h: 16h CE até 16h: 8h CE, com ração e água *ad libitum*. Os animais do grupo TP-Li foram submetidos ao mesmo protocolo fotoperiódico, com Cloreto de Lítio (0,6g/L) administrado em água potável por oito dias, do primeiro ao último dia do regime TP. Os testes de Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, Nado Forçado e Placa Perfurada, foram realizados para avaliar hiperatividade, ansiedade, comportamento de risco, depressão, dentre outros. O grupo TP -Li apresentou diminuição da exposição ao risco, comportamento exploratório e de hiperlocomção quando comparado ao TP e semelhante ao grupo controle. Os achados demonstram que a administração de lítio previne o comportamento similar à mania observado na condição experimental. Este estudo contribui para o estabelecimento de um novo modelo de transtorno bipolar baseado na manipulação da luz ambiente.

Palavras-chave: Transtorno Bipolar; Suicídio; Fotoperíodo; Lítio; Ritmos Circadianos.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a chronic mood disorder, affecting approximately 2-3% of the global population. Mania is a cardinal feature of BD and is characterized by symptoms as impulsivity and hyperactivity. Epidemiological studies show higher occurrence of hospitalizations for manic episodes in periods of accentuated increments in day length, or photoperiod. Consistently, preliminary studies performed by our group indicate that a gradual increase of the photoperiod is associated with a mania-like behavior in C57BL/6 mice. The hypothesis is that gradual variations in photoperiod modulate the circadian rhythms in brain regions associated with mood disorders. Lithium (Li) is a mood stabilizer used in the treatment of bipolar disorders in humans with antimanic and antidepressant properties. Furthermore, Li treatment modulates mood-related behavior in rodents. The aim of this work is to validate the photoperiodic induced mania-like animal model by pharmacologically testing lithium as a mood stabilizer. The animals that were used in the present study are male C57BL/6J mice, distributed into the three groups: (1) EP (*Equatorial Photoperiod*), (2) TP (*Transitional Photoperiod*) and (3) TP-Li. The animals of Eq group were exposed to a light/dark regime (CE) 12h:12h. The TP group consists of mice exposed to a regime of gradual photoperiodic variations (30min at the beginning and 30 min at the end of light phase/day) from 08h:16h CE to a 16h:8h CE, with food and water ad libitum. The TP-Li group animals were submitted to the same photoperiodic protocol but Lithium Chloride (0,6g/L) was administered in drinking water for eight days, from the first day to the last day of the TP regime. Elevated Plus Maze, Open Field Test, Forced Swimming Test and Hole Board were performed to evaluate hyperactivity, anxiety, risk-taking, depression and mania. The TP -Li group showed a decrease in risk exposure, exploratory behavior and hyperlocomotion when compared to the TP and similar to the control group. The findings demonstrate that lithium administration prevents the mania-like behavior observed in the experimental condition. This study contributes to the establishment of a new model of bipolar disorder based on the manipulation of ambient light.

Key-words: Bipolar Disorders; Suicide; Photoperiod; Lithium; Circadian Rhythms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste de doses de lítio	27
Figura 2 – Representação esquemática dos experimentos realizados	28
Figura 3 – Análise Estatística do Teste de Labirinto em Cruz Elevado	32
Figura 4 – Análise Estatística do Teste de Campo Aberto	35
Figura 5 – Análise Estatística do Teste de Nado Forçado	37
Figura 6 - Análise Estatística do Teste da Placa Perfurada	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros comportamentais avaliados no Teste Labirinto em Cruz Elevado	34
Tabela 2 – Parâmetros comportamentais avaliados no Teste de Campo Aberto	36
Tabela 3 – Parâmetros comportamentais avaliados no Teste Placa Perfurada	39

LISTA DE ABREVIATURAS

BIOCEN	Biotério Central
BMAL1	Brain and Muscle Arnt-like Protein 1
CA	Campo Aberto
CE	Claro/Escuro
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
Cry	Cryptochrome
EP	<i>Equatorial Photoperiod</i>
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GSK-3 β	Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
Li	Lítio
NF	Nado Forçado
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
Per	Period
PP	Placa Perfurada
TB	Transtorno Bipolar
TP	<i>Transitional Photoperiod</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Os Ritmos Biológicos e seus Mecanismos de Sincronização	14
2.2 Sazonalidade e Fotoperíodo	17
2.3 Sazonalidade no Transtorno Bipolar e no Comportamento Suicida	18
2.4 Modelos Animais de Mania	20
2.5 O uso do lítio como estabilizador de humor	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	31
5.1 O tratamento preventivo com lítio reduz o comportamento de exposição ao risco induzido por TP	32
5.2 O tratamento preventivo com lítio reduz a hiperlocomoção induzida por TP	34
5.3 O tratamento preventivo com lítio reverte o comportamento similar à mania induzido pelo incremento gradual de fotoperíodo	38
6. DISCUSSÃO	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO 1	53

1. INTRODUÇÃO

Os ritmos biológicos podem ser definidos como um processo que varia periodicamente no tempo, ou seja, é a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período. Esses ritmos podem ser divididos em ultradianos, quando apresentam um período menor do que 20 horas; os infradianos, que possuem mais do que 28 horas; e os circadianos, com período de aproximadamente 24 horas, e sendo esses os mais estudados (BRENNAN et al., 1982; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Os relógios circadianos geram oscilações autossustentáveis e autônomas das células com um período de tempo de aproximadamente de 24 horas. Essas oscilações ajudam o organismo a prever eventos diários, mesmo quando as condições permanecem constantes (sem indicação das fases de claro e escuro). Essa endogenicidade, em mamíferos, é coordenada sistemicamente pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQs). Esses núcleos emitem sinais que coordenam e sincronizam diferentes estruturas e tecidos, permitindo o ajuste temporal de todo o organismo (ALBRECHT, 2012; MOORE, 2013).

O organismo multicelular precisa atuar de forma integrada e sincronizada. A sincronização refere-se à relação de fase estável entre dois ritmos: o ambiental e endógeno, ou osciladores endógenos entre si, de períodos semelhantes. A sincronização fótica é a principal via de sincronização correlata com os ciclos geofísicos e demonstra como a luz é capaz de sincronizar o organismo através dos NSQs (GUO et al., 2006; ALBRECHT, 2012; ROSENTHAL et al., 2021).

Recentemente, pesquisas têm mostrado que os NSQs apresentam perfil rítmico sazonal nos níveis de neurotransmissores e na morfologia, de forma que as células que compõem os NSQs percebem o comprimento do dia guiam as mudanças sazonais ajustando outras vias e outras estruturas para adaptação à essas mudanças (COOMANS; RAMKISOENSING; MEIJER, 2015). O fotoperíodo refere-se à duração da luz no dia, sendo a principal via ambiental utilizada para fornecer informações aos organismos para a determinação da época do ano e a coordenar as adaptações sazonais na fisiologia e no comportamento (PYTER; READER; NELSON, 2005).

As mudanças de fotoperíodo que ocorrem no meio ambiente são contínuas e graduais, sendo mais intensas e sentidas em locais de latitudes mais distantes da zona equatorial. Essas alterações sazonais possuem importante impacto nas populações humanas, identificadas em diferentes níveis, onde os seres humanos exibem uma grande variedade de perfis de expressão

gênica, afetando também o comportamento humano. Nos últimos anos, vários pesquisadores estudaram a influência dos fatores ambientais no início e no curso dos principais transtornos psiquiátricos, bem como no seu tratamento e prognóstico (BUIJS et al., 2016).

Há muito tempo que se levanta a hipótese de que o agravamento do transtorno bipolar está associado a anormalidades do sistema circadiano. Praticamente todos os indivíduos com TB apresentam alterações importantes nas funções circadianas, incluindo sono, atividade, secreção hormonal e apetite (ROYBAL, 2007).

O transtorno bipolar consiste em um transtorno de humor psiquiátrico que atinge cerca de 1-4% da população mundial e é uma doença multifatorial e apresenta diversos sintomas, incluindo recorrências de mania (MUNEER, 2016; SCAINI et al., 2020). Diante da incidência da doença, vários modelos comportamentais para mania vêm sendo investigados na tentativa de simular alguns aspectos das mudanças comportamentais encontradas nesta condição psiquiátrica.

O aparecimento e o agravamento da mania podem circular com um padrão regular, ou até mesmo sazonal, sugerindo um componente circadiano para a sua patologia (BULLOCK et al., 2017; FELLINGER et al., 2019; FICO et al., 2020). Além disso, algumas evidências epidemiológicas apontam um maior número de tentativas de suicídio e suicídio completo durante a primavera, apesar de outras estações também serem associadas, o que aponta um perfil sazonal para o suicídio (CHAUDHARI et al., 2018; COIMBRA et al., 2016).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, expondo camundongos C57BL/6 a um protocolo de variação gradual de fotoperíodo, apontam um comportamento aumentado de exposição ao risco, exploração e atividade locomotora, avaliados por testes comportamentais. A alteração desses comportamentos é um forte indicativo para o comportamento similar à mania em animais (Dados não publicados).

Para validação preditiva desse modelo, utilizamos o Lítio (Li), fármaco mais prescrito na estabilização de humor em pacientes com transtorno bipolar. Além disso, o Li tem sido correlacionado com a redução de taxas de suicídio, exercendo ainda efeitos imunomoduladores e neuroprotetores (CIPRIANI, 2017; DEL MATTO et al., 2020). Nossa hipótese é que tratamento com Lítio previne o comportamento similar à mania induzido por variações graduais de fotoperíodo em modelo animal.

Portanto, um novo modelo animal de transtorno bipolar que inclua mudanças fotoperiódicas pode ajudar a elucidar as bases neurobiológicas, bem como investir em novas

medidas preventivas contra indutores ambientais. Ao nosso conhecimento, não existem outros estudos que induzam camundongos ao comportamento similar à mania através de variações graduais de fotoperíodo, o que torna nosso estudo inédito.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os Ritmos Biológicos e seus Mecanismos de Sincronização

A cronobiologia é um campo da ciência responsável pelo estudo sistemático das características temporais da matéria viva, incluindo os ritmos biológicos. Os ritmos biológicos podem ser definidos como um processo que varia periodicamente no tempo, ou seja, é a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Esses ritmos podem ser classificados em ultradianos, quando possui período menor que 20 horas, tendo como exemplo o fluxo iônico em membranas e o ritmo dos batimentos cardíacos (60-100 batimentos por minuto); infradianos, períodos maiores que 28 horas, que podem ser exemplificados através do ciclo menstrual, durando normalmente 28 dias; e ciclos circanuais, com período de ocorrência em torno de 365 dias; os ritmos circadianos, possuem períodos de aproximadamente 24 horas. Os ritmos circanuais, são classificados como sazonais quando se referem às estações do ano (BRENNAN et al., 1982).

Os ritmos circadianos são os mais estudados, e se tornaram mais conhecidos no ano de 2017, com a divulgação do Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, que reconheceu os pesquisadores norte-americanos Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young pelos estudos que contribuíram para o esclarecimento do funcionamento do relógio biológico interno e sobre os mecanismos moleculares que o gera e o controla (CALLAWAY; LEDFORD, 2017). Esses ritmos estão presentes em diversas características fisiológicas e comportamentais, como variações nos níveis hormonais, expressão gênica, temperatura corporal, comportamento alimentar, ciclo vigília e sono em humanos, atividade e repouso em animais, performance cognitiva, comportamento reprodutivo, entre outros (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003; ALBRECHT, 2012).

Os relógios circadianos geram oscilações autossustentáveis e autônomas das células com um período de tempo de aproximadamente de 24 horas. Acredita-se que tais oscilações tenham evoluído em resposta às fases de claro/escuro e a internalização dessas fases tornou vantajoso para o organismo prever eventos diários, mesmo quando as condições permanecerem constantes (por exemplo, escuro constante) (MARQUES, MENNA-BARRETO, 2003;

ALBRECHT, 2012). Para que exista uma ritmicidade endógena em um ser vivo, é necessário que alguma estrutura opere como um marca-passo, que podem ser definidos como osciladores primários, e exibem padrão oscilatório geneticamente determinado e auto-sustentado (MOORE, 2013).

Em mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos funcionam como marca-passo central, coordenando os ritmos. Os NSQs são compostos por um par de grupos neuronais, localizados no hipotálamo, acima do quiasma óptico. A informação luminosa é detectada pela retina (ambiente externo de entrada), e é transmitida para os NSQs via trato retino-hipotalâmico, sendo conduzida para todo o organismo. Os núcleos supraquiasmáticos emitem sinais que são integrados para ajustar as informações sobre o tempo, que coordena e sincroniza diferentes estruturas e tecidos, dentro e fora do sistema nervoso central, permitindo o ajuste de todos os relógios periféricos. Os relógios periféricos são sincronizados através dos NSQs, e estão presentes em diversas células, tecidos e órgãos, como fígado, glândula adrenal, pâncreas, adipócitos, a fim de que os tecidos estejam numa relação estável de fases. (ALBRECHT, 2012; MOORE, 2013).

No nível molecular, a base de funcionamento dos ritmos é a interação entre alças de retroalimentação transcricional-tradicional, composto por um grupo de genes que são altamente conservados em animais. A primeira alça de retroalimentação, a alça positiva, inclui as proteínas CLOCK e BMAL1, que ativam a transcrição dos genes *Per* (1, 2 e 3) e *Cry* (1 e 2). As proteínas PER e CRY são fosforiladas e formam heterodímeros que inibem CLOCK/BMAL no núcleo celular, reprimindo sua própria transcrição, sendo essa, a segunda alça de transcrição, a alça negativa (TAKAHASHI et al., 2008; HUANG, 2018; HASTINGS; MAYWOOD; BRANCACCIO, 2019).

Os genes que constituem a maquinaria molecular, não são expressos somente nos NSQs, mas também em diversos tecidos e órgãos, como rins, fígado e em diferentes áreas do encéfalo (BUHR; TAKAHASHI, 2013). Dessa maneira, o NSQ tem sido amplamente estudado nas últimas décadas, e uma visão integrada da sua função de marca-passo central vem sendo desenvolvida, estabelecendo relações a nível comportamental, celular e molecular (GUILDING; PIGGINS, 2007; ASTIZ; HEYDE; OSTER, 2019).

O organismo vivo e multicelular precisa atuar de forma integrada e sincronizada. Collin Pittendrigh e Jurgen Aschoff foram pioneiros do campo nas pesquisas sobre a relação entre a adaptação temporal com o organismo e o ambiente. Seus estudos evidenciam que os estados

dos ritmos fisiológicos e comportamentais são associados ao ciclo ambiental para a adaptação do indivíduo, determinando as bases conhecidas como sincronização, onde abrange aspectos circadianos e sazonais. Esses estudos enfatizaram que os efeitos sustentados pela luz, potencialmente alteram a velocidade com que o tempo interno se move em relação ao tempo externo, determinando as bases do que atualmente é conhecido como sincronização (PITTENDRIGH, 1993; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003; FOSTER; ROENNEBERG, 2008).

A sincronização refere-se à relação de fase estável entre dois ritmos: o ambiental e endógeno, de períodos semelhantes. Estes fatores cíclicos que possibilitam a sincronização dos ritmos biológicos, são chamados de Zeitgebers, termo de origem alemã que significa ‘doador de tempo’, ou seja, agente sincronizador. Os Zeitgebers podem ser exemplificados por ciclos ambientais de claro/escuro, relação ambiental entre predador e presa, ciclos de atividades sociais, dentre outros (ASCHOFF, 1960; HEYDE; OSTER, 2019).

A sincronização ocorre através de arrastamento. O arrastamento é o ajuste temporal de um ritmo por um outro ritmo, comumente se referindo ao processo de ajuste temporal de organismos a ciclos ambientais. Quando o ritmo está arrastado, indica que está mantendo relações de fase estáveis com o ciclo arrastador (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

O arrastamento por mudanças instantâneas em respostas a transições é não paramétrico, por não alterar parâmetros do oscilador subjacente. Já no modelo de sincronização paramétrico, o arrastamento por mudanças na velocidade da luz afeta necessariamente um ou mais parâmetros do oscilador quando exposto à luz. Uma vez que a velocidade da luz muda, obviamente, altera também a fase. No entanto, a sincronização paramétrica é a principal via correlata com os ciclos geofísicos de claro/escuro e demonstra como a luz é capaz de sincronizar o organismo (FOSTER; ROENNEBERG, 2008).

A sincronização fóptica é a principal via correlata com os ciclos geofísicos de claro/escuro e demonstra como a luz é capaz de sincronizar o organismo através dos NSQs. Através da estrutura hierárquica do relógio biológico central, a informação luminosa é detectada inicialmente pelas células ganglionares presentes na retina intrinsecamente fotorreceptivas (ipRGCs) que expressam melanopsina e que se projetam para neurônios nos NSQs (GUO et al., 2006; ALBRECHT, 2012; ROSENTHAL et al., 2021).

Estudos indicam que o fotoperíodo modula os ritmos diários através dos NSQs, que geram sinais do comprimento do dia em resposta a estimulação recebida via trato retino hipotalâmico (HOFMAN; SWAAB, 2006).

Recentemente, pesquisas têm mostrado que os NSQs apresentam perfil rítmico sazonal nos níveis de neurotransmissores e na morfologia, de forma que as células que compõe os NSQs percebem o comprimento do dia guiam as mudanças sazonais ajustando outras vias e outras estruturas para adaptação às mudanças sazonais (COOMANS; RAMKISOENSING; MEIJER, 2015).

2.2 Sazonalidade e Fotoperíodo

A sazonalidade refere-se a um fenômeno que apresenta variação de ocorrência conforme a época do ano e que está relacionado com diferenças na disponibilidade de luz ao longo do mesmo. Já o fotoperíodo refere-se à duração da fotofase, sendo a principal via ambiental utilizada para fornecer informações aos organismos para a determinação da época do ano e a coordenar as adaptações sazonais, sendo base para regular as mudanças sazonais na fisiologia e no comportamento (PYTER; READER; NELSON, 2005). O inverno, por exemplo, é caracterizado por dias mais curtos e noites mais longas (Fotoperíodo curto), que difere do verão, com dias mais longos e noites mais curtas (Fotoperíodo longo).

É importante destacar que as respostas fotoperiódicas se distinguem das respostas circadianas, pois, apesar de ambos normalmente apresentarem os mesmos mecanismos para informar ao organismo sobre o comprimento do dia, os ritmos circadianos, como já caracterizado, possui períodos de oscilações em torno de 24 horas, enquanto o fotoperíodo está relacionado com períodos anuais e sazonais (Goldman, 2001).

As mudanças de fotoperíodo que ocorrem no meio ambiente são contínuas e graduais, sendo mais intensas e sentidas em locais de latitudes mais altas ou baixas. Mamíferos que habitam nas latitudes mais elevadas dependem do fotoperíodo, por permitir aos organismos a capacidade de antecipação e que se prepararem comportamental e metabolicamente, para as mudanças ambientais e sazonais (BUIJS et al., 2016).

As alterações sazonais possuem importante impacto em humanos, identificadas em diferentes níveis. Os NSQs apresentam perfil rítmico sazonal em níveis de neurotransmissores

e morfológicamente, de forma que as células que compõem essa estrutura percebem o comprimento do dia e guiam as mudanças sazonais ajustando outras vias e outras estruturas para a adaptação às mudanças sazonais (MERROW; MARTHA; HARRINGTON, 2020). No nível hormonal, a maioria das evidências apontam que a melatonina é um importante mediador de regulação desse calendário sazonal, através da regulação fótica pelos NSQs e que atua levando a informação fotoperiódica a vários órgãos em todo o corpo (GORMAN, 2020).

A sazonalidade foi relatada para vários aspectos fisiológicos, incluindo pressão arterial mais alta durante o inverno do que no verão (STERGIOU et al., 2020); o colesterol, que na população norte americana (EUA), os níveis são mais altos durante a metade do verão e mais baixos na primavera (OCKENE et al., 2004). Além disso, existem diversas evidências epidemiológicas indicam maiores taxas de tentativa de suicídio e suicídio completo durante a primavera (CHAUDHARI et al., 2018; COIMBRA et al., 2016).

As variações climáticas afetam o comportamento humano com manifestações patológicas, como doenças cardiovasculares, autoimunes e infecciosas (STEWART et al., 2017; WATAD et al., 2019; MARTINEZ, 2018). Nos últimos anos, vários pesquisadores estudaram a influência dos fatores ambientais no início e no curso dos principais transtornos psiquiátricos, bem como no seu tratamento e prognóstico (MUNEER, 2016; AGUGLIA; BORSOTTI; MAINA, 2018). Um exemplo é o Transtorno Afetivo Sazonal (Seasonal Affective Disorder), caracterizado como um distúrbio psiquiátrico de perfil sazonal que se manifesta em episódios de depressão que se desenvolvem preponderantemente durante o inverno (MCCLUNG, 2007; PATTEN et al., 2017). Um estudo entre 1996 e 2013, no Canadá, identificou que 70% dos casos de depressão se manifestaram durante o inverno (PATTEN et al., 2017).

2.3 Sazonalidade no Transtorno Bipolar e no Comportamento Suicida

O transtorno bipolar (TB) consiste em um transtorno de humor psiquiátrico que atinge cerca de 1-4% da população mundial (MILLER et al., 2014). Esse transtorno é caracterizado por alterações de humor que alternam entre mania e hipomania ou depressão e estados mistos, associados ao comprometimento funcional do organismo (MUNEER, 2016; SCAINI et al., 2020). Os episódios depressivos são caracterizados por anedonia, sintomas vegetativos e retardo psicomotor. Por outro lado, durante os episódios maníacos ou hipomaníacos, o paciente pode apresentar sintomas relacionados à humor elevado, incluindo euforia, sensação de

grandeza, hiperatividade, aumento da atividade sexual, diminuição da necessidade de sono, comportamentos de risco, agressividade e irritabilidade (SCAINI et al., 2020).

Vários estudos relatam padrões sazonais de internações hospitalares por mania que parecem seguir um padrão sazonal (BULLOCK et al., 2017; FELLINGER et al., 2019; FICO, et al., 2020). Na primavera, os níveis de energia aumentados são seguidos por elevações do humor, que podem levar a sintomas de hipomania ou mania. Em contraste, os níveis de energia diminuem no outono, seguido depois de um humor deprimido (MCCARTY, 2020; ROSENTHAL et al., 2020; ROSENTHAL et al., 2021).

Em uma revisão sistemática de 51 artigos publicados entre 1976 e 2013, examinaram os padrões sazonais das taxas de admissão hospitalar e o início dos sintomas de pacientes com TB, relatam que os episódios maníacos atingiram o pico durante os meses de primavera e verão, com pico menor no outono. Em contraste, os episódios depressivos atingiram o pico no início do inverno e foram menos frequentemente no verão (GEOFFROY et al., 2014). Em um estudo brasileiro, foi observado que a maioria dos casos de hospitalização por mania ocorrem no final do inverno e início da primavera (VOLPE et al., 2010).

Mudanças sazonais na duração e intensidade da luz solar também podem influenciar o primeiro aparecimento de sintomas relacionados ao fenótipo de TB. Em uma pesquisa liderada pelo Dr. Michel Bauer, foi examinado a idade de início do TB em 2.414 pacientes com TB. Foi observado que quanto maior a quantidade de insolação solar mensal no local do paciente no início da doença, menor a idade de início do TB (BAUER et al., 2012).

Há muito tempo que se levanta a hipótese de que o agravamento do transtorno bipolar está associado à anormalidades do sistema circadiano. Praticamente todos os indivíduos com TB apresentam alterações importantes nas funções circadianas, incluindo sono, atividade, secreção hormonal e apetite (ROYBAL, 2007; TAKAESU; TOSHIKAZU 2018).

Estudos têm evidenciado que mudanças estruturais do cérebro e déficits cognitivos não são encontrados de forma consistente no início da doença, e parecem se tornar mais evidentes com a cronicidade de episódios recorrentes. Devido a isso, o TB tem sido sugerido como uma condição progressiva e o atraso no diagnóstico, bem como o tratamento inadequado, pode resultar em sintomas subliminares persistentes, no desenvolvimento de comorbidades e progressão da doença com comprometimento cognitivo e declínio funcional. O mau prognóstico para esta doença, também está parcialmente relacionada aos altos níveis de suicídio, com metade dos indivíduos com início precoce da doença, tentando suicídio

(GEOFFROY et al., 2013). Essa alta prevalência de tentativa de suicídio, que continua sendo o fator preditivo mais forte para o suicídio real, contribui para colocar os pacientes com TB entre aqueles com maior risco de suicídio, sendo sua taxa de suicídio é de 20 a 30 vezes a da população em geral (POMPILI, 2013; SCAINI et al., 2020).

Algumas evidências epidemiológicas apontam um maior número de tentativas de suicídio e suicídio completo durante a primavera, apesar de outras estações também serem associadas (CHAUDHARI et al., 2018). Foi demonstrado no estudo de Coimbra et al. (2016), que em populações diferentes, as tentativas de suicídio são mais altas durante o final da primavera e início do verão, independentemente do sexo. Em outra revisão, apresentando vários estudos com continentes e latitudes, relatam picos nas taxas de internação hospitalar por episódios depressivos no início do inverno e por episódios de mania na primavera-verão (GEOFFROY et al., 2013). Esses estudos demonstram que o aparecimento da mania pode circular com um padrão regular, ou até mesmo sazonal, sugerindo um componente circadiano para a sua patologia.

Nas últimas décadas, novas técnicas investigativas têm sido empregadas para descobrir a fisiopatologia do TB, originando a expectativa de que novas descobertas levem a tratamentos mais eficazes para os pacientes desse transtorno. Compreender como o fotoperíodo modula o comportamento de mania, será uma evidência capaz de fornecer informações que no futuro poderão explicar a sazonalidade, não só do TB, mas de várias doenças.

2.4 Modelos Animais de Mania

Um modelo animal pode ser uma espécie específica ou uma cepa que demonstra similaridade comportamental ou biológica com um distúrbio e pode, portanto, ser homólogo a ele. O uso de modelos animais abrange vários tipos de validação (Face, Constructo e Preditiva) e é de extrema importância para a nossa compreensão de doenças psiquiátricas.

A validação de face se refere à extensão em que um modelo animal recapitula características importantes da doença humana, como fenótipos bioquímicos, neuroanatômicos e/ou comportamentais. Já a validação de constructo, implica que os fatores biológicos e comportamentais observados apresentem a mesma origem etiológica da doença em humanos. Frequentemente, refere-se a relevância ou natureza translacional dos métodos pelos quais um

modelo é construído, podendo ser alcançado expondo um animal a um fator de risco ambiental, provocando uma mutação genética ou alteração das proteínas, por vias de sinalização ou neurocircuitos que postulam estar envolvidos na patogênese (BOURIN et al., 2007).

A validade preditiva, é geralmente definida como a extensão em que o modelo animal responde a um tratamento eficaz em humanos. Modelos animais de mania geralmente recebem estabilizadores de humor utilizados para o tratamento de transtorno bipolar em humanos, sendo mais utilizado o lítio, para investigar uma possível normalização ou reversão dos endofenótipos semelhantes aos de mania (BOURIN et al., 2007).

Devido a estrutura geral do cérebro em mamíferos ser semelhante em várias espécies, ocorre uma similaridade à nível fisiológico, bioquímico, anatômico, molecular e comportamental (LEONARDO; HEN, 2008; HOHOFF, 2009). Os animais são fundamentais para a pesquisa, pois mimetizam algumas características elementares de um estado patológico específico, o que favorece para sua compreensão e na busca de terapias eficazes. Porém, estas semelhanças não podem sugerir que os animais apresentem o comportamento patológico, pois são transtornos apresentados tipicamente em humanos.

O Transtorno bipolar apresenta diversos sintomas, incluindo recorrências de mania. Uma estratégia que pode ter considerável utilidade na identificação das bases genéticas do TB, é uma abordagem baseada em endofenótipos. Achados neurofisiológicos, bioquímicos, endócrinos, cognitivos, neuropsicológicos anormais, são características que costumam se apresentar em doenças psiquiátricas, permitindo a partir daí melhorias na avaliação diagnóstica e no desenvolvimento de estudos em modelos animais (LENOX et al., 2002). O comportamento similar a mania em animais, é caracterizado por comportamento com aumentos na busca por recompensa, exposição ao risco, agressão e locomoção (HANNAH-POQUETTE, 2011).

A escassez de modelos animais adequados para o transtorno bipolar dificulta a pesquisa da fisiopatologia da doença e o desenvolvimento de novos tratamentos (GOULD; EINAT, 2007). Apesar dessas dificuldades à modelagem do TB em animais, vários modelos comportamentais para mania vêm sendo investigados na tentativa de simular alguns aspectos das mudanças comportamentais encontradas nesta condição psiquiátrica (Machado-Vieira et al., 2004).

Os modelos animais de mania mais conhecidos dependem fortemente da indução de hiperatividade em resposta a drogas que modulam a atividade dopaminérgica. Em Valvassori et al. (2017), induziram ratos *Wistar* (machos e adultos) a um comportamento similar à mania

por meio de uma única injeção de oubaína, administrada através de uma cânula para atingir o ventrículo cerebral lateral direito. Em outro estudo, camundongos *Swiss* foram induzidos ao comportamento tipo maníaco através da administração de metilfenidato (SOUZA et al., 2016).

Psicoestimulantes podem produzir sintomas que se assemelham à mania em indivíduos normais saudáveis, como também exacerbar os sintomas ou à induzir um episódio maníaco em pacientes, e vem sendo utilizado para estudos em animais (MEYENDORFF et al., 1985; PEET; PETERS, 1995, COUSINS et al., 2009). Além da indução por psicoestimulantes, a disrupção dos ritmos circadianos e privação de sono pode desencadear episódios maníacos (MCCLUNG, 2007). No estudo de Dal Pont (2019), camundongos machos C57BL/6 foram induzidos ao comportamento tipo maníaco através de um protocolo de privação de sono.

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, expondo camundongos C57BL/6 a um protocolo de variação gradual de fotoperíodo, apontam um comportamento aumentado de exposição ao risco, exploração e atividade locomotora, avaliados por testes comportamentais (Dados não publicados). Esse padrão é indicativo de um comportamento com similaridade à mania presente no transtorno bipolar, alcançando assim a validade de face e de constructo.

Foram utilizados testes comportamentais já descritos na literatura para identificar comportamento tipo maníaco, inclusive o teste de placa perfurada, desenvolvido para avaliar comportamento similar à mania em animais por meio da atividade locomotora e comportamento exploratório (SOUZA et al., 2016).

A utilização de camundongos C57BL/6 para esse estudo dá-se por sua facilidade de sincronização aos ritmos ambientais, por ser um dos principais modelos genéticos no estudo de ritmos circadianos e por apresentar respostas comportamentais fotoperiódicas associadas a distúrbios psiquiátricos (ADAMAH-BIASSI; HUDSON; DUBOCOVICH, 2015).

Portanto, para que o modelo experimental possa ser considerado de mania, ele deve permitir a mensuração de respostas quantitativas e qualitativas em animais, tanto de forma análoga a condição clínica (em forma e origem etiológica), como também, devem responder à aplicação de drogas no mesmo sentido que elas atuam em seres humanos (FILE, 1987).

2.5 O uso do lítio como estabilizador de humor

O lítio (Li) é um metal leve que leva o nome de uma palavra grega “lithos”, que significa pedra e tem sido amplamente usado, no tratamento de transtornos de humor por mais de meio século. O Li é atualmente considerado o estabilizador de humor de primeira escolha para o tratamento de manutenção do transtorno bipolar. A primeira publicação sobre Li para tratar mania foi realizada por John Cade, há mais de 70 anos, onde foi descoberto que o Li tinha efeitos benéficos em pacientes que sofriam com transtorno bipolar (CADE, 1949). Desde essa descoberta, nenhum outro agente farmacológico para o tratamento de TB foi determinado, tornando o Li um padrão ouro para o tratamento desse transtorno.

Embora os benefícios do lítio na estabilização do humor tenham sido documentados há muito tempo, estudos recentes identificaram uma propriedade notável da droga: sua capacidade de prolongar a sobrevivência. Isso se deve ao fato do Li reduzir mais fortemente a mortalidade do que outros estabilizadores de humor, tendo uma ação terapêutica e preventiva eficaz em episódios recorrentes maníacos e depressivos, que ao contrário da maioria dos tratamentos atuam apenas em um polo dos distúrbios bipolares (CIPRIANI et al., 2005; MULLER-OERLINGHAUSEN et al., 2005).

Além disso, o Li tem sido relacionado com a redução de taxas de suicídio e na prevenção episódios maníacos, ou seja, exercendo efeitos anti-suicidas, imunomoduladores e neuroprotetores (MALHI et al., 2013; WON; KIM, 2017; SMITH; CIPRIANI, 2017; DEL MATTO et al., 2020). No entanto, o Li demonstrou reduzir não apenas a mortalidade por suicídio, mas também a mortalidade não suicida (comorbidades) (CIPRIANI et al., 2005; MULLER-OERLINGHAUSEN et al., 2005; TONDO, BALDESSARINI, 2009; SMITH et al., 2015).

Embora o mecanismo de Li na estabilização de humor ainda permaneça obscuro, tem sido investigado a ação do lítio por meio da regulação circadiana (MOREIRA; GEOFFROY, 2016). Já se sabe que o Li prolonga o período do ritmo circadiano, o que pode contribuir para a estabilização do humor (VADNIE; MCCLUNG, 2017). Foi relatado que Li inibe Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta (GSK-3 β) tanto direta quanto indiretamente, o que implica em uma certa relação entre os efeitos farmacológicos do lítio e os fatores genéticos dos ritmos circadianos (KALADCHIBACHI et al., 2007).

Estudos têm sugerido a Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK3) como um regulador central do relógio circadiano, sendo essa enzima, um alvo conhecido do lítio (HARADA, 2005; IITAKA, 2005; BESING et al., 2015). O Li prolonga o período circadiano em vários

organismos, incluindo *Drosophila*, roedores e humanos, e esse efeito pode ser importante para a eficácia terapêutica (KLEMFUSS, 1992; XU et al., 2021).

O Li reduz a neurotransmissão excitatória (mediada pela dopamina e glutamato, em especial) e aumenta a inibitória (principalmente mediada pelo GABA), modulando uma maior excitabilidade neuronal característica da fase maníaca do TB (MALHI et al., 2013). Diante disso, essa droga pode normalizar neurotransmissões alteradas mediante a modulação funcional das proteínas G, especialmente pela ação inibitória em vias de sinalização intracelular, ao qual inclui a Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK3) (TSELNICKER et al., 2014; ARMANI, 2014).

Como acontece para muitos fármacos, o mecanismo de ação do Li ainda não está bem definido. Diversos mecanismos e processos bioquímicos podem estar envolvidos, e por isso, novos estudos são necessários para compreender a ação do Li no transtorno bipolar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar, em modelo animal, o efeito do lítio na modulação do comportamento similar à mania induzido por variações do fotoperíodo.

3.2 Objetivos específicos

- Reproduzir o protocolo de variação gradual de fotoperíodo denominado TP (*Transitional Photoperiod*) no comportamento similar à mania em animais;
- Avaliar o efeito da administração farmacológica com lítio na prevenção do comportamento similar à mania.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados conforme as exigências previstas na lei Arouca (Lei nº 11.794) de 08 de outubro de 2008, com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) com o número 38/2019 (Anexo 1).

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, machos, com idades entre 12-16 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central (BIOCEN) - UFAL, em uma única leva. Os animais foram alojados em gaiolas com isolamento acústico e de luz externa, com controle de temperatura e sistema de exaustão. Os animais tiveram acesso livre a água e comida.

4.2 Protocolo de fotoperíodo

Os animais foram divididos em 03 grupos (n=10/grupo). No primeiro grupo (EP – Equatorial Photoperiod), os animais ficaram por 8 dias submetidos a ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. No grupo 2 (TP), os animais passaram por 8 dias em 12:12, seguidos de 8 dias de fotoperíodo curto com ciclos de 8 horas de claro e 16 horas de escuro e ao final do fotoperíodo curto, os animais foram submetidos a uma transição. Esta transição consistiu em um aumento gradual de fotoperíodo durante 8 dias, sendo a cada dia acrescido uma hora de luz (30 minutos no início da fase de claro e 30 minutos no final). O terceiro grupo (TP-Li) seguiu o mesmo protocolo do grupo 2, sendo realizado o tratamento farmacológico com cloreto de lítio (Figura 01). No final dos regimes de luz, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

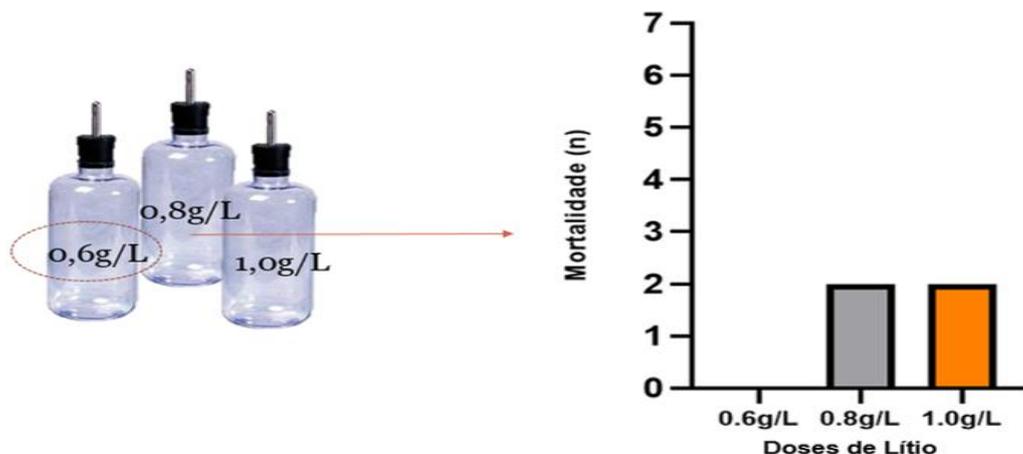
4.3 Tratamento farmacológico

4.3.1 Teste de dosagem de Lítio

Inicialmente foi realizado um teste de dose de lítio com o objetivo de selecionar a dose com menor mortalidade. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=7/cada) e foram utilizadas as seguintes doses: 1g/L, 0,8g/L e 0,6g/L. Essas doses foram selecionadas de estudos que realizaram o tratamento crônico e de forma oral (MILIENNE-PETIOT, 2017; VAN ENKHUIZEN et al., 2015). O lítio foi administrado de forma oral e com livre acesso durante os 8 dias de transição.

Após o término do TP, foram realizados os testes comportamentais. Os animais dos três grupos foram avaliados nos testes, não apresentando diferença significativa entre os grupos nos parâmetros comportamentais avaliados nos testes. No entanto, os dois grupos com maior concentração da dose apresentaram mortalidade, enquanto a menor concentração não apresentou (Figura 01). Além do número de mortalidade, foi observado a presença de tremores em alguns animais tratados com as duas doses mais altas, mas não observado nos animais tratados com 0,6g/L. Dessa forma, foi definido a administração da menor dosagem de lítio (0,6g/L) nos testes.

Figura 01 – Teste de doses de lítio (n=7/grupo). A barra cinza e laranja representam as doses de 0,8g/l e 1,0g/l, respectivamente, com um total de duas mortes em cada grupo. A dosagem de 0,6g/l não apresentou mortalidade.

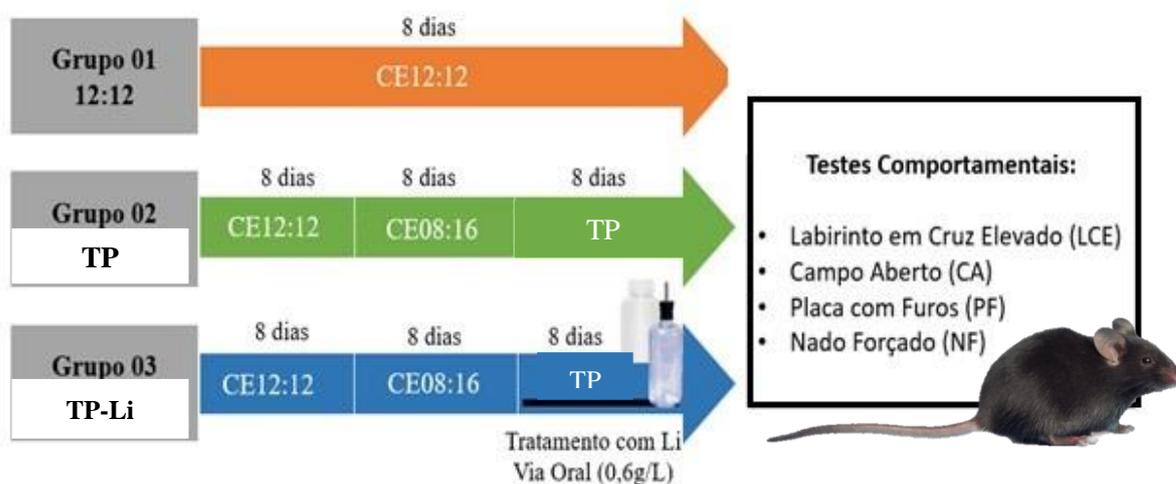


Fonte: Autora da dissertação, 2021.

4.3.2 Tratamento com Lítio

Foi administrado cloreto de lítio (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda) aos animais do grupo TP-Li, para avaliação da possível prevenção dos comportamentos induzidos e observados no grupo TP. O tratamento ocorreu por via oral, com administração de 0,6mg/L de lítio, diluído em água filtrada. Os animais tiveram acesso livre a garrafa de água com lítio durante todo o tratamento. Os camundongos foram submetidos ao protocolo de transição de fotoperíodo anteriormente citado, sendo iniciado o tratamento no primeiro dia de TP e seguindo por mais 7 dias até o final da transição, totalizando assim, 08 dias de tratamento. Após a consumo do lítio, foram realizados todos os testes comportamentais (Figura 02).

Figura 2 – Representação esquemática dos experimentos realizados.



Fonte: Autora da dissertação, 2021.

4.3 Testes Comportamentais

Foram realizados os testes de Labirinto em Cruz Elevado, Campo aberto, Placa Perfurada e Pré-nado, respectivamente em um mesmo dia (Penúltimo dia do TP), e no dia seguinte (Último dia do TP) se deu continuidade com o Teste de Nado Forçado. Os testes foram iniciados no ZT06 e realizados no Laboratório de Neurofisiologia e Farmacologia Integrativa (LNFI-ICBS/UFAL). Os comportamentos foram avaliados pela análise dos testes gravados

através de uma filmadora digital Intelbras. As análises ocorreram de forma cega por duas avaliadoras.

4.3.1 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Teste utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso e de exposição ao risco. É baseado na aversão do camundongo a áreas abertas ou elevadas, assim como o comportamento natural exploratório a novos ambientes (KOMADA et al., 2008). O instrumento consiste em quatro braços, sendo dois abertos e dois outros envolvidos por paredes laterais. Os braços são dispostos perpendicularmente uns aos outros, formando uma cruz, e são elevados alguns centímetros (geralmente 40 ou 50 cm) do solo. O procedimento-padrão consiste em expor livremente os animais por 5 minutos (cada animal, individualmente) ao labirinto. Cada sessão tem início com a inserção do animal no centro do aparelho, com a face voltada para os braços fechados. Foi realizada a quantificação das variáveis espaciais e temporais (Tempo e número de entradas nos braços abertos e fechados), além de outros parâmetros comportamentais, como levantar, esticar, mergulhar e auto-limpeza. O critério utilizado para definição de entrada e saída de um braço para o outro do labirinto foi a presença das quatro patas dentro e fora do mesmo, respectivamente (AZIZI, 2018).

4.3.2 Teste de Campo Aberto (CA)

Teste utilizado para avaliação do comportamento ansioso e atividade locomotora espontânea. É comumente utilizado para acessar ansiedade, através de mensurações como tempo gasto no centro do aparelho, os primeiros minutos e perfil de defecções do animal (BASSANI et al., 2014). O teste de campo aberto, foi executado em uma caixa circular, com o fundo dividido em dezesseis quadrados iguais divididos por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no centro da caixa, para que explorem livremente a arena por 5 minutos. O teste foi filmado, e posteriormente, os vídeos foram utilizados para avaliar o número de cruzamentos e tempo gasto nos quadrantes do centro e periferia, além de outros parâmetros comportamentais como levantar, esticar e autolimpeza.

4.3.3 Teste da Placa Perfurada (PP)

Esse teste foi desenvolvido para avaliar o comportamento exploratório e mania através da interação dos animais com os orifícios (FILE; WARDILL, 1975). O teste consiste em uma placa de acrílico que foi inserida ao teste de campo aberto, elevada 5 cm do solo. A placa contém 16 orifícios, sendo 4 localizados no centro e 12 na periferia. Os furos contêm cerca de 3 cm de diâmetro, equidistantes em uma placa circular de 30 cm de diâmetro.

Os animais foram colocados no centro do aparato e filmados por 10 min. Os parâmetros analisados foram: Tempo de permanência no centro e tempo de permanência na periferia. Número de interações nos furos do centro e número de interações com os furos da periferia. Foram consideradas interações apenas os mergulhos de cabeça realizados. Os parâmetros etológicos avaliados foram: autolimpeza e levantar.

4.4.4 Teste de Nado Forçado (NF)

Teste utilizado para avaliar depressão. Para a realização deste teste foram utilizados recipientes de vidro cilíndrico medindo 20 cm de altura e um diâmetro de 20 cm. Os animais individualmente foram colocados no cilindro de vidro, preenchidos com água da torneira a 25°C com profundidade ajustada de acordo com o tamanho do animal. Esses animais foram observados por sessões de 7 minutos de duração, no primeiro dia, considerado pré-nado, com o objetivo que o animal se familiarize com o teste, e no outro dia foi realizado o mesmo procedimento para análise. Foi registrada a latência, a duração e frequência de mobilidade e imobilidade. Considerando que camundongos apresentam uma elevada frequência de comportamento exploratórios e de fuga durante os primeiros 2 min de teste, os últimos 5 min correspondem ao tempo no qual os animais mostram maior imobilidade (BUSHNELL; STUPP, 2009).

Todos os vídeos foram lidos por duas avaliadoras (E.F.L.C e M.R.B), de forma cega.

4.5 Análise Estatística

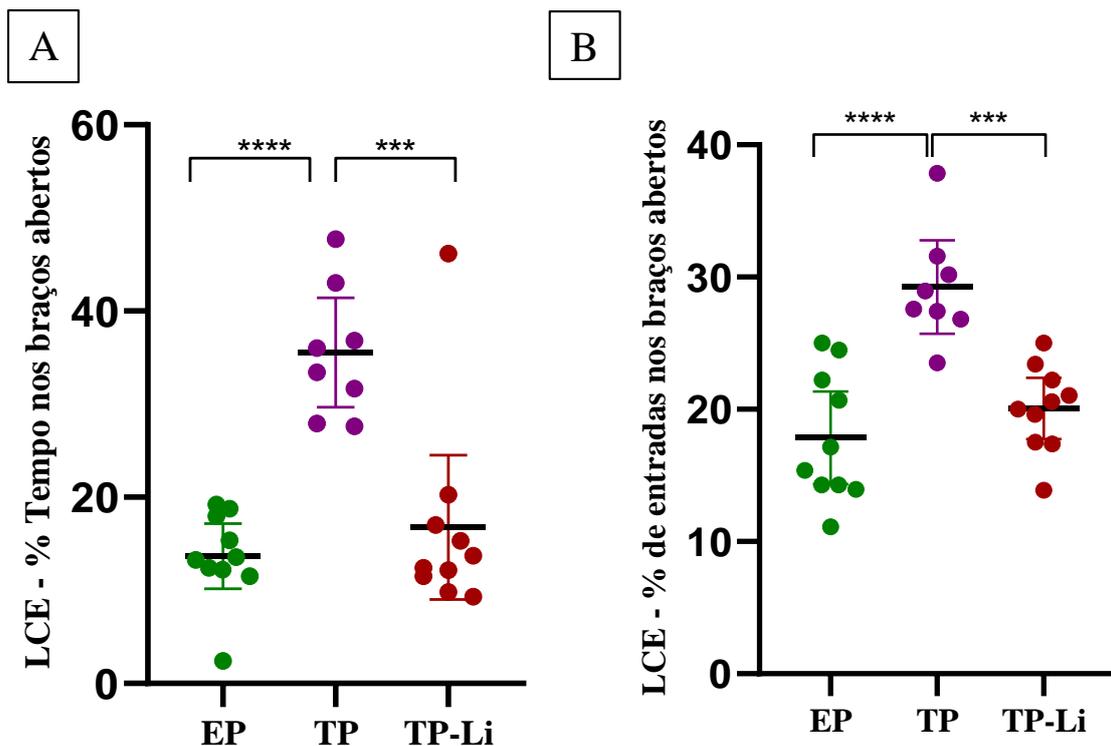
Para análise dos dados comportamentais foram utilizados os dados brutos e as porcentagens dos parâmetros avaliados nos testes comportamentais. As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA (com test post-hoc de Tukey), utilizando o software prisma 8. A apresentação dos dados foi realizada por média e intervalo de confiança (95%). Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5%.

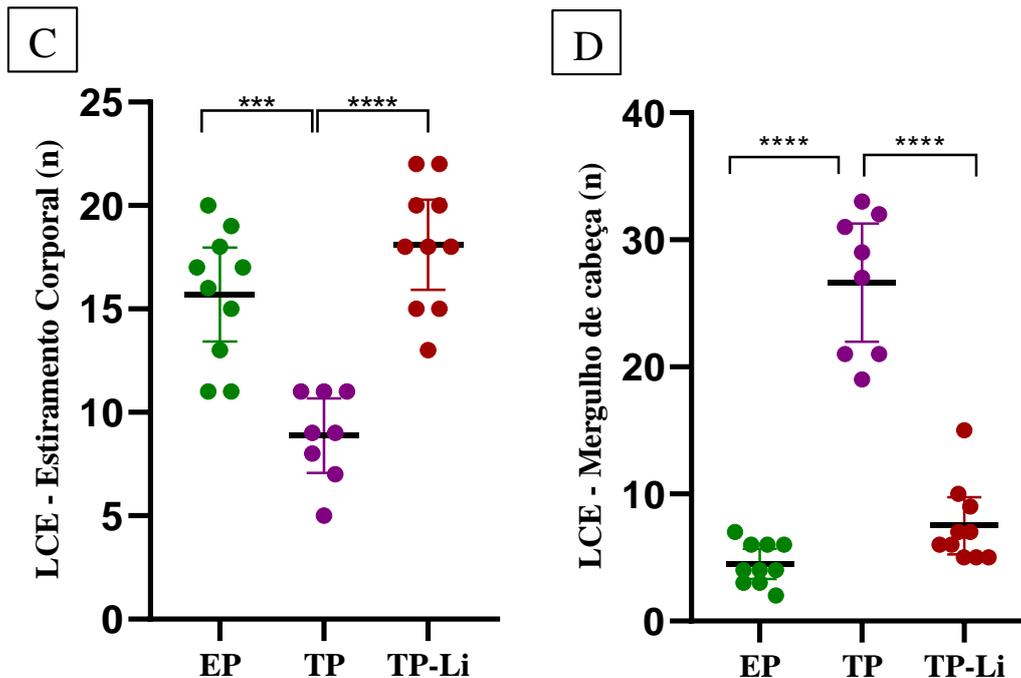
5. RESULTADOS

5.1 O tratamento preventivo com lítio reduz o comportamento de exposição ao risco induzido por TP

Os animais tratados com Li e avaliados no teste de labirinto em cruz elevado apresentaram níveis menores de permanência e o número de entradas nos braços abertos do teste (Figura 3A-3B), comparados com TB sem tratamento. Considerando os parâmetros etológicos, os animais tratados realizam um número menor de mergulhos de cabeça quando comparado ao grupo TP (Figura 3D). Também foi observado, que o número de estiramento corporal foi aumentado no grupo TP-Li em comparação ao TP, assemelhando-se ao grupo EP. Esses resultados indicam uma diminuição de exposição ao risco após o tratamento preventivo com lítio.

Figura 3 – Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE). EP (Equatorial Photoperiod), TP (Trasitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photoperiod + Lithium). Dados apresentados em média e intervalo de confiança de 95%. (A) Porcentagem de tempo nos braços abertos ANOVA $p=0,0001$. (B) Porcentagem de entradas nos braços abertos ANOVA $p=<0,0001$. (C) Estiramento Corporal ANOVA $p=0,0001$. (D) Mergulho de Cabeça ANOVA $p=<0,0001$.





Fonte: Autora da dissertação, 2021.

Na tabela 1, os resultados demonstram que o grupo TP, comparados com o EP, apresentou diminuição da porcentagem do número de entradas nos braços fechados ($p=0,0026$), tempo gasto nos braços fechados ($p<0,0001$) e no comportamento de autolimpeza, diminuição essa não apresentada pelos animais tratados preventivamente com Li ($p=0,0006$). O parâmetro de levantar não apresentou diferença estatística ($p=0,2043$).

Tabela 1 – Parâmetros comportamentais avaliados em). EP (Equatorial Photoperiod), TP (Transitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photoperiod + Lithium) no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Resultados da ANOVA com teste post-hoc de Tukey, apresentados em média \pm DP e valor de P, considerando o intervalo de confiança de 95%.

Parâmetros	Grupos			Valor de P
	EP	TP	TP-Li	
% de Tempo nos Braços Abertos	13,68 \pm 4,86	35,54 \pm 7,03	16,78 \pm 10,85	<0,0001*AC
% de Tempo nos Braços Fechados	71,61 \pm 9,47	45,17 \pm 5,68	61,71 \pm 8,28	<0,0001*AC
% de Entradas nos Braços Fech/ados	37,78 \pm 7,19	27,48 \pm 6,22	33,28 \pm 2,02	<0,0001*AC
% de Entradas nos Braços Abertos	17,86 \pm 4,88	29,24 \pm 4,22	20,07 \pm 3,22	0,0026*AC
Estiramento Corporal	15,70 \pm 3,16	8,87 \pm 2,16	18,10 \pm 3,03	<0,0001*AC
Mergulho de Cabeça	4,50 \pm 1,65	26,63 \pm 5,55	7,50 \pm 3,13	<0,0001*AC
Levantar	21,90 \pm 3,60	25,13 \pm 7,33	20,30 \pm 5,61	0,2043
Autolimpeza	10,40 \pm 1,71	7,50 \pm 1,51	11,70 \pm 2,49	0,0006*AC

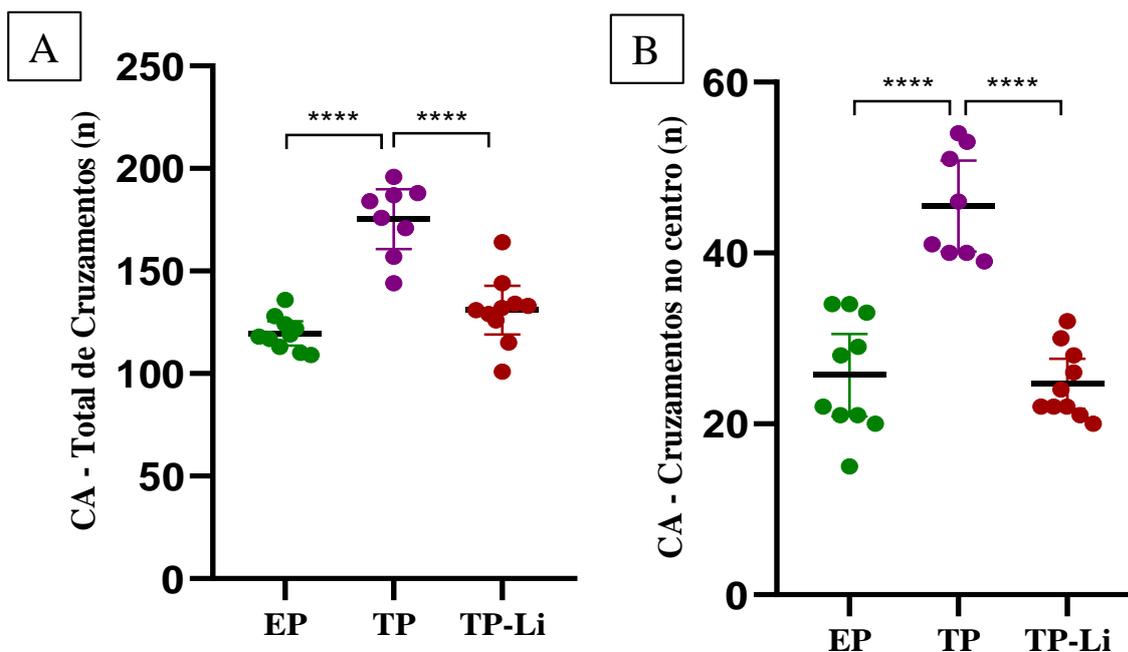
* $p < 0,05$. (A) EP vs. TP; (B) EP vs. TP-Li; (C)TP vs TP-Li.

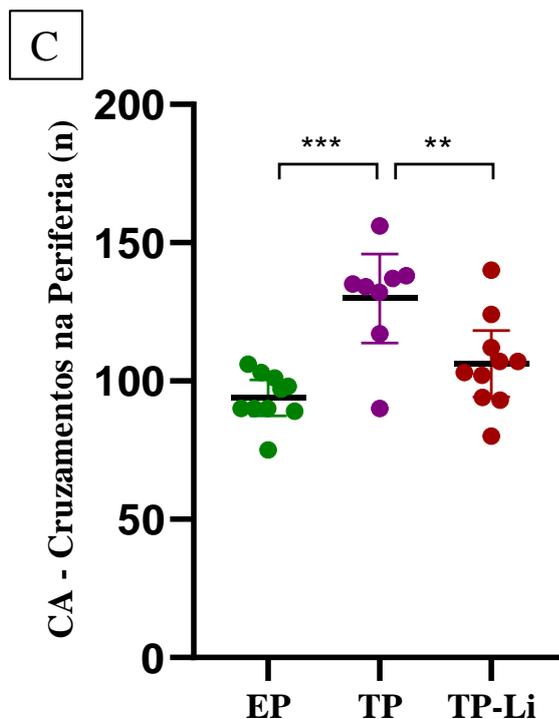
Fonte: Autora da Dissertação, 2021.

5.2 O tratamento com lítio previne o aumento do comportamento exploratório induzido por TP

Os animais expostos ao TP apresentaram um maior número de cruzamentos totais, no centro e na periferia do campo aberto quando comparado ao grupo EP, representando assim, um aumento no comportamento exploratório dos animais. Quando tratados preventivamente com lítio, apresentam comportamento exploratório semelhante ao EP, havendo uma diminuição quando comparados aos animais do grupo TP. Esse comportamento foi observado no teste de campo aberto através do número de cruzamentos dos quadrantes do centro, da periferia e o número de cruzamentos totais (Figura 4A-C).

Figura 4 – Teste de Campo Aberto (CA). EP (Equatorial Photoperiod), TP (Trasitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photoperiod + Lithium). Dados apresentados em média e intervalo de confiança de 95%. (A) Número total de cruzamentos ANOVA $p=0,0001$. (B) Número de cruzamentos no centro ANOVA $p<0,0001$. (C) Número de cruzamentos na periferia ANOVA $p=0,0002$.





Fonte: Autora da dissertação, 2021.

O tempo gasto no centro foi maior nos camundongos TP comparando com o grupo controle, já o grupo TP-Li apresentou tempo similar ao EP. Conseqüentemente, o tempo gasto na periferia diminuiu nos animais do grupo TP em comparação ao EP e TP-Li, que não apresentaram diferença significativa. O parâmetro de levantar também aumentou no grupo TP em comparação ao controle, aumento esse não apresentado nos animais tratados com Li. O comportamento de autolimpeza não apresentou diferença significativa nesse teste (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros comportamentais avaliados em EP (Equatorial Photoperiod), TP (Trasitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photperiod + Lithium) no Teste de Campo Aberto (CA). Resultados da ANOVA com teste post-hoc de Tukey, apresentados em média±DP e valor de P, considerando o intervalo de confiança de 95%.

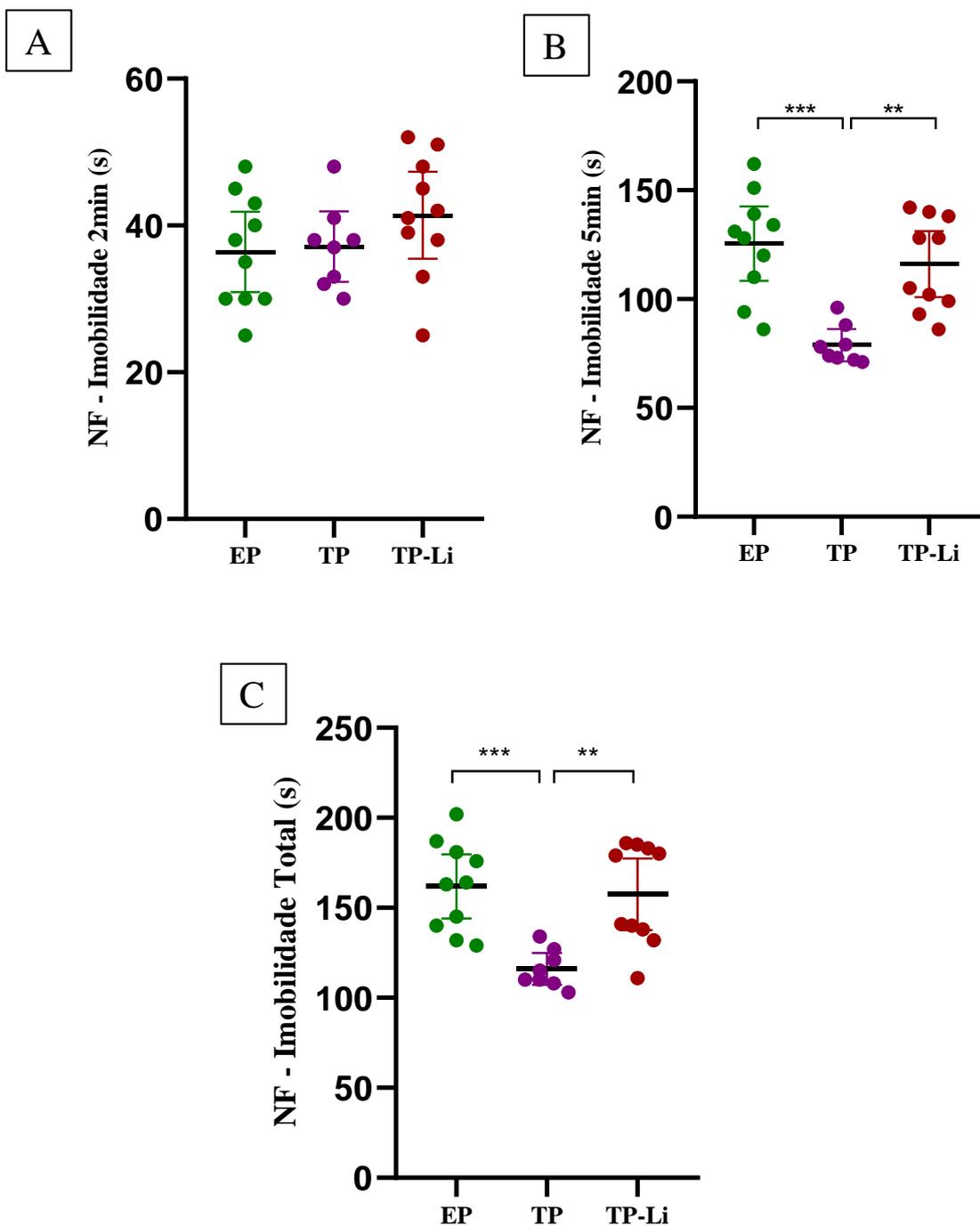
Parâmetros	Grupos			Valor de P
	EP	TP	TP-Li	
Número de Cruzamentos Totais	119,6±8,31	175,4±17,47	130,9±16,52	<0,0001*AC
Número de Cruzamentos na Periferia	93,9±9,02	129,9±19,28	106,2±16,77	0,0002*AC
Número de Cruzamentos no Centro	25,7±6,77	45,5±6,35	24,7±4,11	<0,0001*AC
Tempo Gasto na Periferia	238,0±12,06	218,0±14,05	241,9±11,03	0,0009*AC
Tempo Gasto no Centro	62,03±12,07	81,97±14,04	58,08±11,04	0,0010*AC
Levantar	27,50±6,45	36,13±3,83	28,40±5,98	0,0073*AC
Autolimpeza	15,20±7,37	13,88±1,88	13,40±3,23	0,7055

* p < 0,05. (A) EP vs. TP; (B) EP vs. TP-Li; (C)TP vs TP-Li.

Fonte: Autora da dissertação, 2021.

No teste de Nado Forçado, os animais submetidos ao TP apresentaram um tempo menor de imobilidade total, indicando maior agitação e aumento da atividade exploratória. Os camundongos tratados preventivamente com lítio, apresentam o tempo de imobilidade que se assemelha ao dos animais controle. (Figura 5A-C). Isso demonstra que o Li apresenta uma ação protetora a esses comportamentos observados no grupo TP.

Figura 5 – Teste de Nado Forçado (NF). EP (Equatorial Photoperiod), TP (Trasitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photperiod + Lithium) (A) Tempo de Imobilidade nos 2 primeiros minutos ANOVA p= 0,2890. (B) Tempo de Imobilidade nos últimos 5 minutos ANOVA p=0,0001. (C) Tempo total de imobilidade (7 minutos) ANOVA p=0,0005.



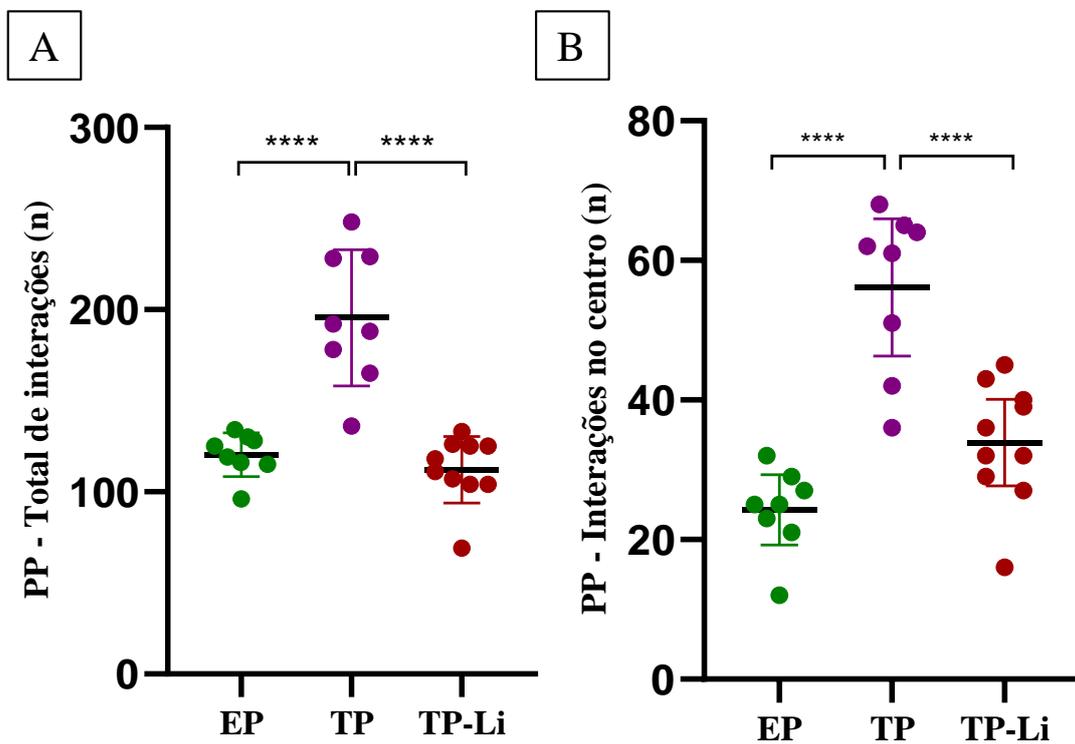
Fonte: Autora da dissertação, 2021.

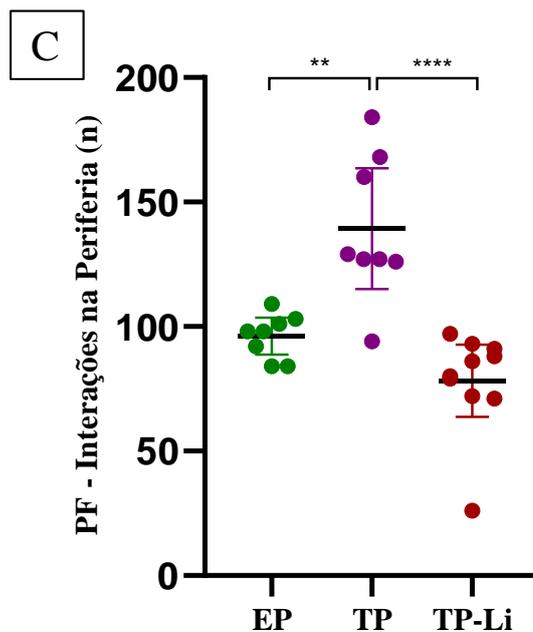
Nossos resultados demonstram que o tratamento preventivo com Li foi eficaz na prevenção do aumento da atividade exploratória apresentado por animais que passaram pelo protocolo de variação gradual de fotoperíodo sem tratamento.

5.3 O tratamento com lítio previne o comportamento similar à mania induzido pelo incremento gradual de fotoperíodo no teste de placa perfurada

Nesse teste foi observado que os animais tratados preventivamente com Li apresentaram um número menor de interações totais, do centro e da periferia em comparação ao grupo TP (Figura 6A-C). Esses resultados mostram que o comportamento aumentado de exploração (característico de mania) observados no grupo TP não foi observado no grupo tratado com Li, o que sugere que o tratamento com Li foi eficaz na prevenção de comportamentos tipo maníaco.

Figura 6 - Teste da Placa Perfurada (PF). EP (Equatorial Photoperiod), TP (Trasitional Photoperiod) e TP-Li (Trasitional Photoperiod + Lithium). (A) Número total de interações com os furos ANOVA $p < 0,0001$. (B) Número de interações nos furos do centro ANOVA $p < 0,0001$. (C) Número de interações nos furos da periferia ANOVA $p < 0,0001$.





Fonte: Autora da dissertação, 2021.

Nos demais parâmetros observados não houve diferença estatística para o tempo gasto na periferia e no centro. O comportamento de autolimpeza também não apresentou diferença nesse teste (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros comportamentais avaliados em EP (Equatorial Photoperiod), TP (Transitional Photoperiod) e TP-Li (Transitional Photoperiod + Lithium) no Teste de Placa Perfurada (PF). Resultados da ANOVA com teste post-hoc de Tukey, apresentados em média±DP e valor de P, considerando o intervalo de confiança de 95%.

Parâmetros	Grupos			Valor de P
	EP	TP	TP-Li	
Tempo gasto no Centro	151,1±24,13	173,5±23,76	167,6±62,56	0,5669
Tempo gasto na Periferia	448,9±24,13	425,2±25,65	432,4±62,56	0,5449
Número de Interações no Centro	24,25±6,01	56,13±11,78	33,90±8,64	<0,0001*AC
Número de Interações na Periferia	96,13±8,90	139,4±29,0	78,30±20,31	<0,0001*AC
Número de Interações Totais	120,4±11,96	195,5±37,38	112,2±18,30	0,0328*AC
Levantar	19,25±4,59	18,88±4,82	12,0±5,35	0,9414
Autolimpeza	11,25±2,43	10,75±1,03	12,0±3,49	0,6028

* p < 0,05. (A) EP vs. TP; (B) EP vs. TP-Li; (C) TP vs TP-Li.

Fonte: Autora da Dissertação, 2021.

6. DISCUSSÃO

Mudanças sazonais de fotoperíodo apresentam alguns impactos já conhecidos nas funções comportamentais e fisiológicas, incluindo os efeitos no humor (MERROW; MARTHA; HARRINGTON, 2020). No transtorno bipolar, episódios maníacos agudos foram associados com um avanço no ritmo circadiano endógeno, enquanto indivíduos depressivos apresentam um atraso no seu ciclo (LEE, HEON-JEONG, 2019). Dessa forma, pacientes com TB apresentam alterações importantes nas funções circadianas e perturbações no sono, e consequentemente, apresentam sintomas de mania e comportamento suicida (ROYBAL, 2007; TAKAESU; TOSHIKAZU 2018). Comportamentos suicidas podem estar relacionados com os ritmos circadianos, por um possível desalinhamento entre os ritmos endógenos e os ambientais (MOON et al., 2016; CHO et al., 2016). Esse desalinhamento pode ocorrer devido à mudança aguda do ritmo circadiano causada pelo aumento da exposição à luz na primavera (CHO; LEE, 2018).

Como as condições naturais de variações fotoperiódicas (estações) mudam continuamente de maneira cíclica, neste trabalho, animais C57BL/6 foram expostos a um protocolo de mudança gradual e rápida de fotoperíodo (TP), lembrando o ambiente durante a primavera, análogo aos dados epidemiológicos citados. O protocolo de TP, induziu o aumento de exposição ao risco e exploração, mimetizando o comportamento maníaco. Com o objetivo de validar farmacologicamente o modelo, utilizamos o estabilizador de humor mais receitado na clínica médica para o tratamento de pacientes com TB. Em outros estudos, o Li foi capaz de prevenir e/ou reverter, por exemplo, os comportamentos similares à mania em animais induzidos por oubaína (VALVASSORI et al., 2017) e pela privação de sono (ARMANI et al., 2012; ABRIAL et al., 2015).

Nossos resultados demonstram que a administração de lítio concomitante ao TP preveniu os comportamentos de maior exposição ao risco, locomoção e exploração, que se mostraram aumentados no grupo experimental TP em comparação ao grupo com fotoperíodo equatorial. Os resultados de comportamentos obtidos do grupo tratado com lítio se mostram similares aos do grupo controle, o que fortalece a hipótese de uma ação protetora do Li para variações graduais de fotoperíodo.

No tratamento com Lítio, a compreensão dos requisitos de dosagem é fundamental para otimizar o potencial dos resultados terapêuticos positivos, por isso é muito importante saber

exatamente quanto de lítio é suficiente para um indivíduo sem causar toxicidade (CHAN et al., 2020). A variação farmacocinética e farmacodinâmica interindividual tornou essa determinação um desafio, tanto para humanos quanto para estudos em animais. Várias abordagens têm sido utilizadas para investigar as concentrações de lítio mais adequadas, sendo uma das melhores é designar os indivíduos a diferentes concentrações e avaliar seu efeito terapêutico em cada dosagem (SPROULE, 2002). Em nosso estudo, utilizamos três grupos de animais com diferentes dosagens (1,0g/L, 0,8g/L e 0,6g/L) diluídas em água potável e oferecida em *ad libitum* durante oito dias. Após avaliação dos testes comportamentais, constatamos que a dose de 0,6g/L foi a mais adequada por apresentar um resultado eficaz de prevenção a mania, não afetar significativamente a saúde dos animais (ou seja, não foram observadas desidratação, perda de peso ou tremores nas patas) e não apresentar mortalidade dentro desse grupo experimental.

O aumento do comportamento exploratório e de exposição ao risco são considerados características marcantes do comportamento similar à mania, que são altamente comparáveis para pacientes bipolares e para roedores expostos a drogas estimulantes (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011). Em nosso estudo, realizamos o teste de labirinto em cruz elevado, teste de campo aberto e teste de nado forçado para avaliação da exposição ao risco, locomoção e comportamento exploratório.

Roybal et al. (2007), utilizaram camundongos mutantes Clock e camundongos selvagens (controle), machos e com 6 a 10 semanas, expostos a um regime de 12h de claro e 12h de escuro. Foi observado que os animais mutantes Clock, apresentaram níveis maiores de atividade locomotora e exposição ao risco. Esses animais foram tratados com cloreto de lítio, para avaliar uma possível redução desse comportamento similar a mania. No teste de nado forçado, os animais tratados com lítio apresentaram um aumento no tempo de imobilidade dos camundongos Clock para níveis próximos ao do tipo selvagem. Além disso, as respostas comportamentais nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado também retornaram a níveis próximos do tipo selvagem após o tratamento com lítio. Esses resultados sugerem que o tratamento com lítio retoma os níveis de comportamento, relacionados à exposição ao risco e hiperlocomoção, onde nosso estudo corrobora com o de Roybal et al. (2007).

Além desses já mencionados, avaliamos também o comportamento exploratório por meio do teste de placa perfurada, frequentemente utilizado para avaliar mania. Esse comportamento se caracteriza como o ato de tornar o desconhecido conhecido e é uma função fundamental encontrada entre todas as espécies vivas. Estudos pré-clínicos que visam modelar

a mania são comumente baseados na agitação psicomotora avaliada pelo aumento da locomoção espontânea (YOUNG; HENRY; GEYER, 2011; SHARMA et al., 2016). O comportamento exploratório anormal é característico de uma série de condições neuropsiquiátricas importantes, como a atividade excessiva observada na mania bipolar (HANNAH-POQUETTE, 2011). Além disso, a hiperatividade (ou seja, aumento do comportamento motor) é um critério central para estados maníacos e é tão importante quanto o humor elevado e/ou irritável para o diagnóstico e presente nos modelos animais de mania (ANGST et al., 2003; BARBOSA et al., 2011; TONELLI et al., 2013)

Souza, et al. (2016) utilizaram camundongos *Swiss* machos com idade entre 12 e 16 semanas, tendo como objetivo propor o teste placa perfurada como uma nova ferramenta para estudar comportamentos tipo mania em camundongos. Os animais foram induzidos ao comportamento de mania através da administração de metilfenidato e avaliados pelos testes comportamentais de campo aberto e de placa perfurada. Nesse estudo, o metilfenidato aumentou as interações com os furos da placa, tanto na parte central como periférica e o pré-tratamento com lítio previniu significativamente o aumento da interação com os furos. Esses achados, se assemelham aos resultados obtidos no nosso estudo.

No estudo de Dal Pont (2019), foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas e mantidos em um regime de luz de CE 12h:12h. Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar os efeitos do lítio nos parâmetros comportamentais em um modelo animal de mania induzido por privação de sono. Os animais que passaram pelo protocolo de privação de sono apresentaram aumento no número de cruzamentos no centro do teste de campo aberto, diferindo dos animais pré-tratados com lítio que não apresentaram esse comportamento maníaco induzido pela privação de sono, o que corrobora com nossos achados.

O Li é o tratamento de primeira linha na terapia do transtorno bipolar, sendo eficiente na prevenção do suicídio. (MALHI et al., 2013; DEL MATTO et al., 2020). Os mecanismos pelos quais o Li regula o humor, ainda não são completamente conhecidos. Sua ação terapêutica tem sido relacionada a sua capacidade de modular o ritmo circadiano (ALDA, 2015). Embora algumas observações possam estar em contradição, as descobertas mais consistentes indicam que Li atrasa a fase do ritmo de sono-vigília e o pico de elevação da temperatura corporal do ciclo diurno (MOREIRA; JEVERSON; GEOFFROY, 2016; ALDA, 2015). Além disso, o tratamento crônico com Li parece estabilizar os ritmos de atividade em roda de corrida, melhorando o perfil do ritmo da atividade diária (MOREIRA; JEVERSON; GEOFFROY, 2016). Os mecanismos do lítio em resposta ao comportamento induzido pelo fotoperíodo

podem estar relacionados a diversas vias circadianas, como por exemplo, por mudanças na expressão de vários genes do relógio que atuam como fatores de transcrição que regulam as oscilações do relógio e/ou por via GSK3b, sugerida como um regulador central do relógio circadiano e sendo essa enzima um alvo de inibição do Li (BESING, 2017). Entretanto, novos ensaios experimentais precisam ser realizados para a comprovação dessa hipótese.

Nosso estudo, foi possível demonstrar que variações graduais e rápidas de fotoperíodo induz os animais a um aumento do comportamento exploratório e de exposição ao risco, comportamentos esses, que são prevenidos com o tratamento com Li concomitante com o protocolo TP. Para definir ainda mais esse modelo de mania, vários experimentos devem ser realizados para a exploração de mecanismos que nos ajude a compreender a fisiopatologia do TB e como nossos achados pode ajudar a elucidar novos aspectos neurobiológicos relacionados ao efeito maníaco, bem como seus efeitos preventivos contra mudanças ambientais. Ao nosso conhecimento, não existem outros estudos que utilizem um protocolo de variação gradual e rápida de fotoperíodo e como essa variação de luz e fotoperíodo influencia no comportamento tipo maníaco em modelo animal, o que torna nosso estudo pioneiro e inédito.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que os camundongos C57BL/6 expostos à variações graduais e rápidas de fotoperíodo podem constituir um modelo para transtorno bipolar, particularmente estados de mania. Os efeitos protetores do Li na não indução de alterações comportamentais é uma forte evidência de que o modelo reproduz aspectos neurobiológicos e comportamentais de pacientes.

A falta de modelos animais adequados para o comportamento de mania, tem sido uma das maiores dificuldades do campo. Nossos achados podem ser particularmente úteis para estudar a fisiopatologia da mania.

Ao nosso conhecimento, não existem outros estudos que induzam camundongos ao comportamento similar a mania através de variações da luz e do fotoperíodo, o que torna nosso trabalho inédito.

REFERÊNCIAS

- ABRIAL, Erika et al. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. pyu031, 2015.
- ADAMAH-BIASSI, E. B.; HUDSON, R. L.; DUBOCOVICH, M. L. Genetic deletion of MT1 melatonin receptors alters spontaneous behavioral rhythms in male and female C57BL/6 mice. *Hormones and behavior*, v. 66, n. 4, p. 619-627, 2014.
- AGUGLIA, Andrea; BORSOTTI, Antonio; MAINA, Giuseppe. Bipolar disorders: is there an influence of seasonality or photoperiod?. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 40, n. 1, p. 6-11, 2018.
- ALBRECHT, U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246–60, 26 abr. 2012.
- ALDA, Martin. Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. **Molecular psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 661-670, 2015.
- ANGST, Jules et al. Diagnostic issues in bipolar disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. 43-50, 2003.
- ARMANI, Fernanda et al. Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 2, p. 119-125, 2012.
- ARMANI, Fernanda. Estudo comportamental e bioquímico da coadministração de lítio e tamoxifeno em modelo animal de mania. 2014.
- ASTIZ, Mariana; HEYDE, Isabel; OSTER, Henrik. Mechanisms of communication in the mammalian circadian timing system. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 343, 2019.
- ASCHOFF, Jürgen. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1960. p. 11-28.
- AZIZI, Maryam et al. Therapeutic effect of perinatal exogenous melatonin on behavioral and histopathological changes and antioxidative enzymes in neonate mouse model of cortical malformation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 68, p. 1-9, 2018.
- BARBOSA, Francisco J. et al. Magnesium sulfate and sodium valproate block methylphenidate-induced hyperlocomotion, an animal model of mania. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 1, p. 64-70, 2011.
- BASSANI, Taysa B. et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain research**, v. 1593, p. 95-105,

2014.

BAUER, Michael et al. Impact of sunlight on the age of onset of bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 14, n. 6, p. 654-663, 2012.

BESING, Rachel C. et al. Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. **Journal of biological rhythms**, v. 30, n. 2, p. 155-160, 2015.

BESING, Rachel C. et al. GSK3 activity regulates rhythms in hippocampal clock gene expression and synaptic plasticity. **Hippocampus**, v. 27, n. 8, p. 890-898, 2017.

BOURIN, Michel et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 21, n. 6, p. 567-574, 2007.

BRENNAN, P. J. et al. Seasonal variation in arterial blood pressure. **British medical journal** (Clinical research ed.), v. 285, n. 6346, p. 919-923, 1982.

BUHR, Ethan D.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular components of the mammalian circadian clock. In: *Circadian clocks*. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 3-27.

BULLOCK, Ben; MURRAY, Greg; MEYER, Denny. Highs and lows, ups and downs: Meteorology and mood in bipolar disorder. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173431, 2017.

CADE, John FJ. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. **Medical Journal of Australia**, 1949.

CALLAWAY, Ewen; LEDFORD, Heidi. Medicine Nobel awarded for work on circadian clocks. **Nature News**, v. 550, n. 7674, p. 18, 2017.

CIPRIANI, Andrea et al. Lithium in the prevention of suicidal behavior and all-cause mortality in patients with mood disorders: a systematic review of randomized trials. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 10, p. 1805-1819, 2005.

CHAN, B. S. et al. Effect of age on the severity of chronic lithium poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 58, n. 11, p. 1023-1027, 2020.

CHAUDHARI, Nishith K. et al. Seasonal variation of suicide: A brief review. **International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine**, v. 21, n. 1and2, p. 20-27, 2018.

CHO, Chul-Hyun et al. Molecular circadian rhythm shift due to bright light exposure before bedtime is related to subthreshold bipolarity. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

CHO, Chul-Hyun; LEE, Heon-Jeong. Why do mania and suicide occur most often in the spring?. **Psychiatry investigation**, v. 15, n. 3, p. 232, 2018.

COIMBRA, Daniel Gomes et al. Do suicide attempts occur more frequently in the spring too? A systematic review and rhythmic analysis. **Journal of affective disorders**, v. 196, p. 125-137, 2016.

COOMANS, Claudia P.; RAMKISOENSING, Ashna; MEIJER, Johanna H. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 37, p. 29-42, 2015.

COUSINS, David A.; BUTTS, Kelly; YOUNG, Allan H. The role of dopamine in bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 11, n. 8, p. 787-806, 2009.

DAL-PONT, Gustavo C. et al. Effects of lithium and valproate on behavioral parameters and neurotrophic factor levels in an animal model of mania induced by paradoxical sleep deprivation. **Journal of psychiatric research**, v. 119, p. 76-83, 2019.

DEL MATTO, L. et al. Lithium and suicide prevention in mood disorders and in the general population: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 142-153, 2020.

FELLINGER, Matthäus et al. Seasonality in bipolar disorder: Effect of sex and age. **Journal of affective disorders**, v. 243, p. 322-326, 2019.

FICO, Giovanna et al. Clinical correlates of seasonality in bipolar disorder: A specifier that needs specification?. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, 2020.

FILE, Sandra E. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 7, p. 877-886, 1987.

FOSTER, Russell G.; ROENNEBERG, Till. Human responses to the geophysical daily, annual and lunar cycles. **Current biology**, v. 18, n. 17, p. R784-R794, 2008.

GEOFFROY, Pierre Alexis et al. Reconsideration of bipolar disorder as a developmental disorder: importance of the time of onset. **Journal of Physiology-Paris**, v. 107, n. 4, p. 278-285, 2013.

GEOFFROY, Pierre Alexis et al. Seasonality and bipolar disorder: a systematic review, from admission rates to seasonality of symptoms. **Journal of Affective Disorders**, v. 168, p. 210-223, 2014.

GOLDMAN, Bruce D. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. **Journal of biological rhythms**, v. 16, n. 4, p. 283-301, 2001.

GORMAN, Michael R. Temporal organization of pineal melatonin signaling in mammals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 503, p. 110687, 2020.

GOULD, Todd D.; EINAT, Haim. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 6, p. 825-831, 2007.

GUILDING, Clare, and HUGH D. Piggins. "Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?." **European Journal of Neuroscience** 25.11 (2007): 3195-3216.

- GUO, H., BREWER, J. M., LEHMAN, M. N., & BITTMAN, E. L. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. **Journal of Neuroscience**, 26(24), 6406-6412, 2016.
- HANNAH-POQUETTE, Chelsey et al. Modeling mania: Further validation for Black Swiss mice as model animals. **Behavioural brain research**, v. 223, n. 1, p. 222-226, 2011.
- HARADA, Yuko et al. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31714-31721, 2005.
- HASTINGS, Michael H.; MAYWOOD, Elizabeth S.; BRANCACCIO, Marco. The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. **Biology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2019.
- HEYDE, Isabel; OSTER, Henrik. Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- HOFMAN, Michel A.; SWAAB, Dick F. Living by the clock: the circadian pacemaker in older people. **Ageing research reviews**, v. 5, n. 1, p. 33-51, 2006.
- HOHOFF, Christa. Anxiety in mice and men: a comparison. **Journal of neural transmission**, v. 116, n. 6, p. 679-687, 2009.
- HUANG, Rong-Chi. The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Biomedical journal**, v. 41, n. 1, p. 5-8, 2018.
- IITAKA, Chisato et al. A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian circadian clock. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29397-29402, 2005.
- JONES, Steven H. Circadian rhythms, multilevel models of emotion and bipolar disorder—an initial step towards integration?. **Clinical psychology review**, v. 21, n. 8, p. 1193-1209, 2001.
- KALADCHIBACHI, Sevag A. et al. Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: a molecular link in the therapeutic action of lithium. **Journal of circadian rhythms**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2007.
- KLEMFUSS, Harry. Rhythms and the pharmacology of lithium. **Pharmacology & therapeutics**, v. 56, n. 1, p. 53-78, 1992.
- KOMADA, Munekazu; TAKAO, Keizo; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Elevated plus maze for mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 22, p. e1088, 2008.
- LEE, Heon-Jeong. Circadian misalignment and bipolar disorder. **Chronobiology in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 132-136, 2019.
- LENOX, Robert H.; GOULD, Todd D.; MANJI, Husseini K. Endophenotypes in bipolar disorder. **American journal of medical genetics**, v. 114, n. 4, p. 391-406, 2002.

LEONARDO, E. David; HEN, Rene. Anxiety as a developmental disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 134-140, 2008.

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

MALHI, Gin S. et al. Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. **CNS drugs**, v. 27, n. 2, p. 135-153, 2013.

MARQUES N, MENNA-BARRETO LC. Princípios e aplicações. São Paulo: Edusp. 2003.

MARTINEZ, Micaela Elvira. The calendar of epidemics: Seasonal cycles of infectious diseases. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 11, p. e1007327, 2018.

MCCARTY, Richard. Stress and mental disorders: Insights from animal models. **Oxford University Press**, 2020.

MCCLUNG, Colleen A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. **Pharmacology & therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 222-232, 2007.

MERROW, Martha; HARRINGTON, Mary. A functional context for heterogeneity of the circadian clock in cells. **PLoS biology**, v. 18, n. 10, p. e3000927, 2020.

MEYENDORFF, Elaine et al. Methylphenidate infusion in euthymic bipolars: effect of carbamazepine pretreatment. **Psychiatry research**, v. 16, n. 4, p. 303-308, 1985.

MILIENNE-PETIOT, Morgane et al. The effects of reduced dopamine transporter function and chronic lithium on motivation, probabilistic learning, and neurochemistry in mice: Modeling bipolar mania. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 260-270, 2017.

MILLER, Shefali; DELL'OSSO, Bernardo; KETTER, Terence A. The prevalence and burden of bipolar depression. **Journal of affective disorders**, v. 169, p. S3-S11, 2014.

MOON, Joung-Ho et al. Advanced circadian phase in mania and delayed circadian phase in mixed mania and depression returned to normal after treatment of bipolar disorder. **EBioMedicine**, v. 11, p. 285-295, 2016.

MOORE, Robert Y. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 119, p. 1-28, 2013.

MOREIRA, Jeverson; GEOFFROY, Pierre Alexis. Lithium and bipolar disorder: impacts from molecular to behavioural circadian rhythms. **Chronobiology international**, v. 33, n. 4, p. 351-373, 2016.

MÜLLER-OERLINGHAUSEN, Bruno et al. The impact of lithium long-term medication on suicidal behavior and mortality of bipolar patients. **Archives of Suicide Research**, v. 9, n. 3, p. 307-319, 2005.

MUNEER, Ather. The neurobiology of bipolar disorder: an integrated approach. **Chonnam medical journal**, v. 52, n. 1, p. 18-37, 2016.

OCKENE, Ira S. et al. Seasonal variation in serum cholesterol levels: treatment implications and possible mechanisms. *Archives of internal medicine*, v. 164, n. 8, p. 863-870, 2004.

PATTEN, S. B. et al. Seasonal variation in major depressive episode prevalence in Canada. **Epidemiology and psychiatric sciences**, v. 26, n. 2, p. 169-176, 2017.

PEET, Malcolm; PETERS, Steve. Drug-induced mania. **Drug safety**, v. 12, n. 2, p. 146-153, 1995.

PITTENDRIGH, Colin S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual review of physiology**, v. 55, n. 1, p. 17-54, 1993.

POMPILI, Maurizio et al. Epidemiology of suicide in bipolar disorders: a systematic review of the literature. **Bipolar disorders**, v. 15, n. 5, p. 457-490, 2013.

PYTER, Leah M.; READER, Brenda F.; NELSON, Randy J. Short photoperiods impair spatial learning and alter hippocampal dendritic morphology in adult male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 18, p. 4521-4526, 2005.

ROSENTHAL, Sandra J. et al. Seasonal effects on bipolar disorder: A closer look. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 115, p. 199-219, 2020.

ROSENTHAL, Sandra J. et al. Rate of change in solar insolation is a hidden variable that influences seasonal alterations in bipolar disorder. **Brain and Behavior**, p. e02198, 2021.

ROYBAL, Kole et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 15, p. 6406-6411, 2007.

SCAINI, Giselli et al. Neurobiology of bipolar disorders: a review of genetic components, signaling pathways, biochemical changes, and neuroimaging findings. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 42, p. 536-551, 2020.

SHARMA, Ajaykumar N. et al. Modeling mania in preclinical settings: A comprehensive review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 66, p. 22-34, 2016.

SMITH, Eric G. et al. Mortality associated with lithium and valproate treatment of US Veterans Health Administration patients with mental disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 207, n. 1, p. 55-63, 2015.

SMITH, Katharine A.; CIPRIANI, Andrea. Lithium and suicide in mood disorders: updated meta-review of the scientific literature. **Bipolar disorders**, v. 19, n. 7, p. 575-586, 2017.

SOUZA, L. S. et al. Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole board test. **Neuroscience letters**, v. 629, p. 143-148, 2016.

- SPROULE, Beth. Lithium in bipolar disorder. **Clinical pharmacokinetics**, v. 41, n. 9, p. 639-660, 2002.
- STERGIOU, George S. et al. Seasonal variation in blood pressure: Evidence, consensus and recommendations for clinical practice. Consensus statement by the European Society of Hypertension Working Group on Blood Pressure Monitoring and Cardiovascular Variability. **Journal of hypertension**, v. 38, n. 7, p. 1235-1243, 2020.
- STEWART, Simon et al. Seasonal variations in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 11, p. 654, 2017.
- TAKAESU, Yoshikazu. Circadian rhythm in bipolar disorder: a review of the literature. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 72, n. 9, p. 673-682, 2018.
- TAKAHASHI, Joseph S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 764-775, 2008.
- TONDO, Leonardo; BALDESSARINI, Ross J. Long-term lithium treatment in the prevention of suicidal behavior in bipolar disorder patients. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 18, n. 3, p. 179-183, 2009.
- TONELLI, Denise AG et al. The antimanic-like effect of phenytoin and carbamazepine on methylphenidate-induced hyperlocomotion: role of voltage-gated sodium channels. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 650-655, 2013.
- TSELNICKER, Isabella Farhy et al. Dual regulation of G proteins and the G-protein-activated K⁺ channels by lithium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 13, p. 5018-5023, 2014.
- VADNIE, Chelsea A.; MCCLUNG, Colleen A. Circadian rhythm disturbances in mood disorders: insights into the role of the suprachiasmatic nucleus. **Neural plasticity**, v. 2017, 2017.
- VALVASSORI, Samira S. et al. Lithium and tamoxifen modulate behavior and protein kinase C activity in the animal model of mania induced by ouabain. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 11, p. 877-885, 2017.
- VAN ENKHUIZEN, Jordy et al. Modeling bipolar disorder in mice by increasing acetylcholine or dopamine: chronic lithium treats most, but not all features. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 18, p. 3455-3467, 2015.
- VOLPE, Fernando Madalena et al. Further evidence of seasonality of mania in the tropics. **Journal of Affective Disorders**, v. 124, n. 1-2, p. 178-182, 2010.
- WATAD, Abdulla et al. Seasonality and Autoimmune Diseases. In: Mosaic of Autoimmunity. **Academic Press**, 2019. p. 229-234.

WON, Eunsoo; KIM, Yong-Ku. An oldie but goodie: lithium in the treatment of bipolar disorder through neuroprotective and neurotrophic mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 12, p. 2679, 2017.

XU, Ni et al. Effect of lithium on circadian rhythm in bipolar disorder: A systematic review and meta-analysis. **Bipolar Disorders**, 2021.

YOUNG, Jared W.; HENRY, Brook L.; GEYER, Mark A. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1263-1284, 2011.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Intervenção com lítio e melatonina em modelo comportamental similar a mania induzida por variações fotoperiódicas”, registrada com o nº 38/2019, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 09 de abril de 2020.

Vigência da autorização	20.04.2020 a 20.04.2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	512
Peso/idade	28 g / 8-12 semanas
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central / Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI – ICBS – Ufal
Colaboradores	Ellyda F.L.Costa, Mayara R.Barbosa, Daniel G. Coimbra, José L.A.Santos, Aluísio A.B. de Mesquita, Carine R.A. de Barro, Maria D.N.Souza, Vinícius T.B.C.Pinto e Bruno N.Wanderley

Maceió, 16 de abril de 2020.

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479