

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**MODELANDO EFEITOS AGUDOS DA RUPTURA DE RITMOS EM CAMUNDONGOS  
COM RELEVÂNCIA A TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

LUÍSA KLAUS PILZ

PORTO ALEGRE

2014

LUÍSA KLAUS PILZ

**MODELANDO EFEITOS AGUDOS DA RUPTURA DE RITMOS EM CAMUNDONGOS  
COM RELEVÂNCIA A TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Luísa Klaus Pilz

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Elaine Elisabetsky

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Paz L. Hidalgo

PORTO ALEGRE

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Pilz, Luísa Klaus

Modelando efeitos agudos da ruptura de ritmos em camundongos com relevância a transtornos psiquiátricos / Luísa Klaus Pilz. -- 2014. 78 f.

Orientadora: Elaine Elisabetsky.

Coorientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. ritmos biológicos. 2. camundongos. 3. antidepressivos. 4. N-acetilcisteína. 5. glutamato. I. Elisabetsky, Elaine, orient. II. Hidalgo, Maria Paz Loayza, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Laércio, e ao meu irmão, Rafael, pelo amor e apoio incondicionais, por estarem sempre presentes e comemorarem comigo cada vitória. Aos meus avós e demais familiares, pelos infinitos sorrisos e risadas proporcionados, pelo apoio e por me ensinarem a ver o lado positivo em qualquer situação.

À minha orientadora, Elaine, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade concedida, pela disponibilidade, por ‘mergulhar’ na Cronobiologia comigo e pelo conhecimento construído. Agradeço, em especial, pelos anos em que estive no grupo de pesquisa, que fizeram com que meu amor pela ciência crescesse ainda mais.

À minha co-orientadora, Maria Paz, por me apresentar à Cronobiologia, pelos ensinamentos e paciência na hora das análises, por me acolher no laboratório, por disponibilizar os equipamentos necessários à realização dos experimentos e pelas ótimas disciplinas de Crono.

À querida Rosa Levandovski, pelos ‘socorros’ prestados, por estar sempre disposta a ajudar e pela contribuição especial na fase final do mestrado.

À amiga Ana Paula Herrmann, pela ótima convivência diária, pela companhia em muitos almoços, pelos debates científicos ou não, pela amizade, pela preocupação, pelos valiosos conselhos e pela ajuda na hora de fazer escolhas.

Às ICs, Caroline Quiles, Yasmine Trojan, Radharani Benvenuti, Gabriela Melo e Roberta Andrejew, pela disposição e dedicação, pela essencial ajuda nos experimentos e pela ótima companhia.

Ao Ricardo, pela agradável companhia no Lab, pela parceria e pela incrível ajuda nas dosagens de corticosterona.

À Viviane Linck, pelos anos dançados que fizeram com que eu chegasse ao Lab, pela amizade e pela alegria contagiante.

Ao pessoal do Laboratório de Etnofarmacologia, aos que estão e que estiveram no grupo de pesquisa durante os anos em que também estive, pelo conhecimento compartilhado, pelas risadas, pela parceria e por tornarem o ambiente sempre acolhedor.

À professora Eliane Dallegrave, pela paciência, pelos ensinamentos e pela disponibilidade na padronização e realização das cirurgias. Às professoras Adriana Coitinho e Carla Dalmaz, pela disponibilização de infraestrutura e pelo auxílio com as dosagens.

Ao pessoal da UEA, em especial à Marta, Fabíola, Eduardo e Tuane, pela atenção, paciência, competência e comprometimento.

A todos meus amigos que estiveram comigo nos momentos em que este trabalho estava sendo realizado. Agradeço pelo apoio moral, pela força que me deram nos momentos difíceis e decisivos, por tornarem meus dias mais alegres e por estarem sempre presentes.

Ao CNPq e Fundo de Investimento à Pesquisa e Eventos (FIPE)/HCPA pelo apoio financeiro concedido.

## SUMÁRIO

### **PARTE I**

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	4
1.1. O Sistema Circadiano .....	4
1.2. Sistema circadiano e estados patológicos .....	10
1.2.1. Sistema circadiano e transtornos do SNC .....	12
1.3. N-acetilcisteína em transtornos psiquiátricos .....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo geral .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19

### **PARTE II**

3. CAPÍTULO I .....	20
Differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6N and CF1 mouse strains to changes in photoperiod .....	20
4. CAPÍTULO II .....	37
Effects of antidepressants on acute rhythm disruption in mice .....	37

### **PARTE III**

5. DISCUSSÃO .....	62
6. CONCLUSÃO .....	65
7. REFERÊNCIAS .....	66

## RESUMO

**Relevância:** A capacidade de prever alterações repetitivas do ambiente (como dia/noite e estações do ano) e se adaptar às mudanças nestes ciclos é vantajosa, o que determinou a permanência dos relógios biológicos ao longo da evolução. Dentre as espécies que usam as transições dia-noite como referência para determinação de rotinas diárias e manutenção de ritmos endógenos, o ser humano é o primeiro a fugir deste padrão. Rejeitando o instinto natural, o estilo de vida atual leva muitos indivíduos a permanecerem acordados durante a noite, e a possibilidade de que a ruptura de ritmos esteja envolvida no desencadeamento de várias patologias vem sendo considerada. Nesse contexto, modelos animais que mimetizem as alterações de ritmo provocadas pelo estilo de vida atual são importantes para a pesquisa translacional aplicada a condições psiquiátricas. Da mesma maneira, a avaliação de como medicamentos interferem nos ritmos ou na ruptura destes é de interesse para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi modelar o efeito agudo da ruptura de ritmos em camundongos e verificar o efeito da imipramina e da N-acetilcisteína (NAC) no modelo. **Métodos:** Inicialmente, ritmos de temperatura em BALB/c, C57BL/6N e CF1 foram caracterizados. Os animais foram mantidos em ciclo 12:12 claro/escuro (CE) por 15 dias, seguidos de 10 dias em ciclo 10:10 CE. Num segundo experimento, camundongos BALB/c foram submetidos a 10 dias em ciclos 12:12 CE seguidos por 7 ou 13 ciclos de 10:10 CE. Quando em 10:10 CE, os animais foram tratados diariamente com salina, imipramina (20 mg/kg) ou NAC (30 mg/kg e 60 mg/kg). Um grupo controle foi mantido em 12:12 CE durante todo o experimento. Testes comportamentais (placa perfurada e preferência social) foram realizados antes dos 10 ciclos 12:12 CE e no 8º ciclo 10:10 LD. Níveis plasmáticos de corticosterona e interleucina-6 foram avaliados ao final do experimento. **Resultados:** A linhagem BALB/c foi a que mostrou alterações de ritmo de temperatura mais expressivas após exposição a ciclo 10:10 CE. Actogramas indicaram que a alteração de fotoperíodo não permitiu encarrilhamento destes ritmos ao do ambiente. Diminuição de amplitudes de temperatura e atividade foram observadas durante o período em ciclo 10:10 CE, um efeito aumentado pela imipramina em determinados ciclos. A mudança de fotoperíodo aumentou níveis de ansiedade (reteste, placa perfurada). NAC não teve efeito sobre os ritmos e preveniu a alteração de ansiedade provocada pela mudança de ritmo. Não foram encontradas diferenças significativas no comportamento de preferência social ou dosagens plasmáticas de corticosterona e IL-6. **Conclusão:** A utilização da linhagem BALB/c de camundongos é vantajosa para estudar a associação entre ruptura de ritmos e alterações comportamentais, já que quando submetidos a fotoperíodo 10:10 CE os animais apresentam alterações de ritmos e comportamento. A diminuição da amplitude e, portanto, da robustez dos ritmos induzida pela imipramina pode ter relevância clínica uma vez que se considera a influência da ruptura de ritmos na recorrência de episódios depressivos. A ausência de efeito da NAC na amplitude de ritmos e seu efeito protetor quanto à ansiedade induzida pela alteração de fotoperíodo podem indicar mais uma vantagem deste modulador glutamatérgico que vem sendo considerado no tratamento de várias condições psiquiátricas, incluindo depressão. A modulação da transmissão glutamatérgica parece ser o mecanismo de ação de NAC mais importante para ritmos biológicos, considerando a relevância dos receptores glutamatérgicos no núcleo supraquiasmático.

## ABSTRACT

**Relevance:** The ability to predict repetitive environmental changes (such as day/night and seasons) and adapt to changes in these cycles is advantageous, and determined the permanence of biological clocks throughout evolution. Among the species that use the day-night transitions as a reference for determination of daily routines and maintenance of endogenous rhythms, humans are the first to break the pattern. The current lifestyle leads many individuals to reject their natural instinct and stay awake at night, and the possibility that rhythms disruption is involved in the onset of a number of diseases has been considered. In this context, animal models that mimic rhythm changes caused by current lifestyles are important for translational research applied to psychiatric conditions. Likewise, the evaluation of how drugs interfere with rhythms or its disruption is of interest to develop new therapeutic approaches. **Purposes:** The purpose of this study are to model the acute effect of rhythm disruption in mice, as well as to verify the effect of imipramine and N-acetylcysteine (NAC) in the model. **Methods:** Initially, temperature rhythms in BALB/c, C57BL/6N and CF1 mice were characterized. The animals were kept in 12:12 h light/dark (LD) cycles for 15 days, followed by 10 days in 10:10 h light/dark cycles. In a second experiment, BALB/c mice were subjected to 10 days under 12:12 LD followed by 7 or 13 10:10 LD. When at 10:10 LD, animals were treated daily with saline, imipramine (20 mg/kg) or NAC (30 and 60 mg/kg). A control group was kept at 12:12 LD throughout the experiment. Behavioral tests (hole-board and social preference) were performed before the 12:12 LD and at the 8th 10:10 LD cycle. Plasma levels of corticosterone and interleukin-6 were assessed at the end of the experiment. **Results:** BALB/c was the mice strain presenting the most expressive changes in temperature rhythms. Actograms indicated that changes in photoperiod did not allow entrainment of activity and temperature rhythms to the environment. Decreased activity and temperature amplitudes were observed during the period under 10:10 LD, and this effect was increased by imipramine in certain cycles. The photoperiod modification increased levels of anxiety (hole-board retest). NAC had no effect on the rhythms and prevented the anxiety caused by photoperiod change. No significant differences were found in social preference or plasma levels of corticosterone and IL-6. **Conclusions:** BALB/c use is advantageous to study the association between rhythm disturbances and behavioral changes, since when subjected to 10:10 LD animals show significant changes in rhythms and behavior. The decrease in amplitude, and therefore rhythm robustness, induced by imipramine may have clinical relevance since the influence of rhythms disruption on depressive episodes recurrence has been considered. The lacking effects of NAC in rhythms and its protective effect in photoperiod change-induced anxiety may be an additional advantage of this glutamatergic modulator under evaluation for treating various psychiatric conditions, including depression. Among NAC mechanisms of action, the modulation of glutamatergic transmission seems to be the most relevant for biological rhythms, considering the role of glutamate receptors in the suprachiasmatic nucleus.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA-NAT: arilalquilamina N-acetiltransferase

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPc: adenosina monofosfato ciclico

*BMAL*: do inglês, *Brain and Muscle ARNT like protein*

*CLOCK*: do inglês, *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*

*Cry*: do inglês, *Cryptochromes*

iGluR: receptors ionotrópicos de glutamato

mGluR: receptors metabotrópicos de glutamato

NA: noradrenalina

NAC: N-acetilcisteína

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSQ: núcleo supraquiasmático

*Per*: do inglês, *Period*

ROR: do inglês, *Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor*

RORE: do inglês, *ROR Response Elements*



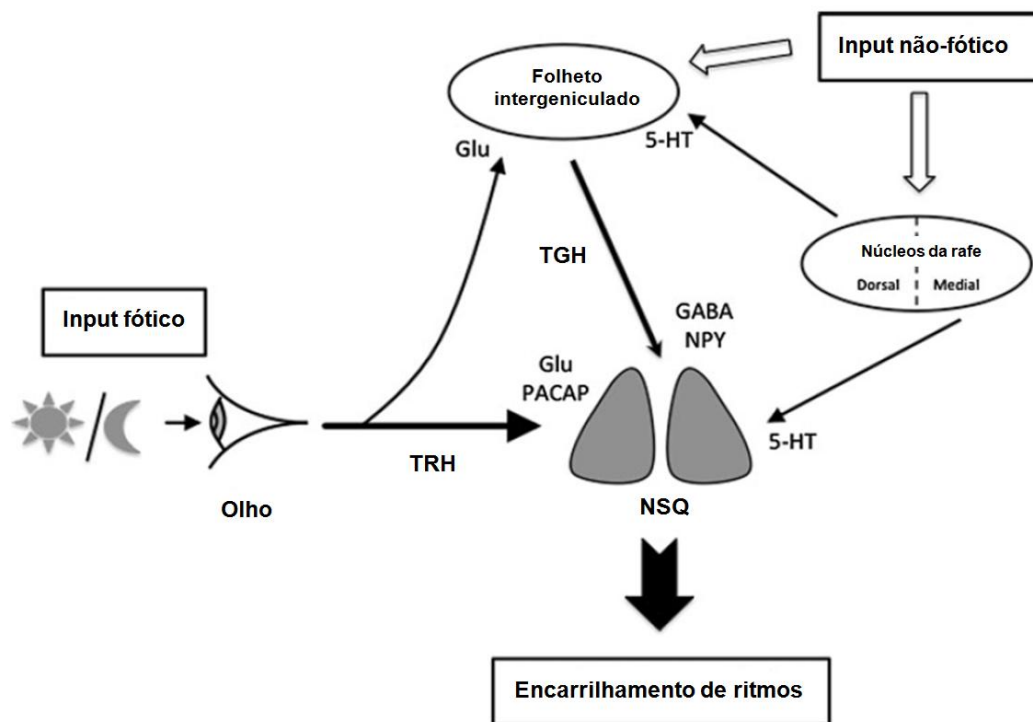
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1.O Sistema Circadiano

Ritmos circadianos de comportamentos e processos fisiológicos são filogeneticamente antigos, podendo ser observados em praticamente todas as plantas e animais. No ser humano, além do ritmo de sono/vigília, processos metabólicos, secreção hormonal, temperatura corporal e função cardíaca, entre outros, ocorrem de maneira rítmica. Tais ritmos são sustentados graças a um sistema circadiano que tem como objetivo manter a coordenação de osciladores internos em diferentes órgãos de maneira a tornar seu funcionamento mais adequado ao organismo como um todo. Este mecanismo é também responsável pela adaptação destes ritmos aos estímulos externos. (Bechtold *et al.*, 2010). A sincronização das atividades associadas a estes órgãos com o ambiente é uma vantagem adaptativa que provavelmente teve papel importante na evolução da vida na Terra (Lall *et al.*, 2012), o que pode explicar a manutenção de mecanismos geradores e controladores de ritmicidade ao longo da escala evolutiva. Ilustrando a relevância da ritmicidade das funções orgânicas, entre 2 e 10% dos genes analisados em estudos de hibridização apresentam oscilações circadianas nos níveis de RNA estável. Estes genes são tecido-específicos e muitos dos produtos regulados circadianamente estão envolvidos nas funções principais de vários órgãos e muitas vezes são passos limitantes nas rotas bioquímicas em que estão inseridos (Akhtar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Reppert & Weaver, 2002).

Os ritmos são mantidos por um marcapasso, ou relógio central, mesmo na ausência de estímulos externos. Nos mamíferos esse relógio se encontra no núcleo supraquiasmático (NSQ). Este marcapasso não só é responsável pela geração de ritmos, mas também pela regulação dos ritmos circadianos periféricos e pelo encarrilhamento dos ritmos com o ambiente (Hastings *et al.*, 2003; Ibuka & Kawamura, 1975; Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). O NSQ está localizado no hipotálamo anterior abaixo do quiasma óptico

(Ralph & Lehman, 1991), recebe informação fótica da retina através do trato retino-hipotalâmico e, indiretamente, através de projeção vinda do folheto intergeniculado. Há ainda uma projeção aferente originária dos núcleos da rafe, que juntamente com o trato genículo-hipotalâmico é responsável pela transmissão de sinais de outros estímulos sincronizadores não-fóticos (Figura 1). O NSQ é formado por duas subregiões que diferem em citoarquitetura, histoquímica, topografia e conectividade, com diferentes padrões de expressão de ‘genes relógio’ e de atividade elétrica. A porção **ventrolateral** é responsiva à luz, mas não apresenta ritmo endógeno, diferente da **dorsomedial**, que gera ritmo endógeno, apesar de receber pouca inervação das vias estimuladas pela luz ou estímulos não-fóticos. (Abrahamson & Moore, 2001; Cassone *et al.*, 1988; Golombek *et al.*, 2013).



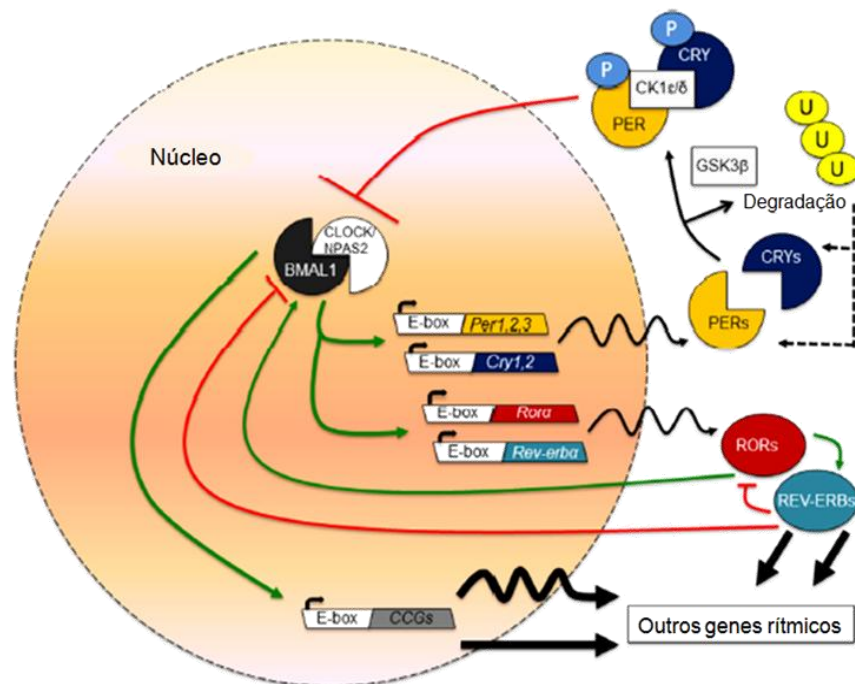
**Figura 1: Estruturas anatômicas envolvidas na sinalização fótica e não-fótica para o NSQ** TRH: trato retino-hipotalâmico; TGH: trato genículo-hipotalâmico; Glu: glutamato; 5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina); PACAP: peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitário; GABA: ácido gama-aminobutírico; NPY: neuropeptídeo Y.

Fonte: adaptado de Lall *et al.*, 2012

Através de projeções do NSQ para outros centros do hipotálamo, este é capaz de controlar o ‘tempo’ das respostas homeostáticas e o ritmo da liberação de hormônios, como por exemplo, a melatonina pela glândula pineal. Através da projeção para o núcleo dorsomedial do hipotálamo e controle do sistema orexina/hipocretina, o NSQ participa da regulação dos ciclos de sono/vigília. Através de projeções para o núcleo paraventricular, o NSQ também pode sinalizar para vias simpáticas e parassimpáticas (Bartness *et al.*, 2001; Bechtold *et al.*, 2010). O NSQ também parece regular os ritmos periféricos através de alterações na temperatura corporal, que serviria como uma referência universal para encarrilhar os diversos outros ritmos aos ciclos de claro/escuro do ambiente (Buhr *et al.*, 2010). Por ser um dos ritmos mais robustos do organismo, ritmos de temperatura são frequentemente utilizados como referência na comparação com outros ritmos (por exemplo, atividade/repouso) permitindo a avaliação da sincronicidade ou dessincronização de ritmos num determinado indivíduo no período específico (Kelly, 2006).

Estudos genéticos e modelos de inativação de genes em moscas e camundongos permitiram a identificação de ‘genes relógios’ cuja função seria marcar o ritmo diário (Grundschober *et al.*, 2001; Reppert & Weaver, 2002; Sato *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 1999). Diversos tecidos, neuronais ou não, possuem ritmos diários de expressão regulados por estes ‘genes relógio’, que se acredita que sejam controlados pelo NSQ. Estudos de biologia molecular revelaram que o mecanismo molecular responsável pelos ritmos circadianos e sua manutenção é baseado em circuitos interligados de retroalimentação (*feedback*) transcricional positivos e negativos (Figura 2). Em resumo, as proteínas *Per* (1,2 e 3) e *Cry* (1 e 2) dimerizam fora do núcleo e voltam para este, onde inibem sua própria expressão por reprimirem a ativação transcricional de CLOCK/BMAL1 através das sequências E-box nos promotores *Per* e *Cry* (Buhr & Takahashi, 2013; Gekakis *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999). Essa alça de retroalimentação negativa ocorre em ciclos de aproximadamente 24 horas. As

proteínas REV-ERB e ROR formam ainda uma segunda alça de retroalimentação, por serem capazes de inibir ou estimular sua expressão, respectivamente, através de ligação no sítio RORE em BMAL1 (Guillaumond *et al.*, 2005). Uma vez no núcleo, as ‘proteínas relógio’ não controlam apenas a sua transcrição, mas também de outros genes, acarretando desta maneira alterações rítmicas na expressão gênica que em última instância levam a alterações rítmicas fisiológicas e comportamentais (Liu & Chu, 2012).

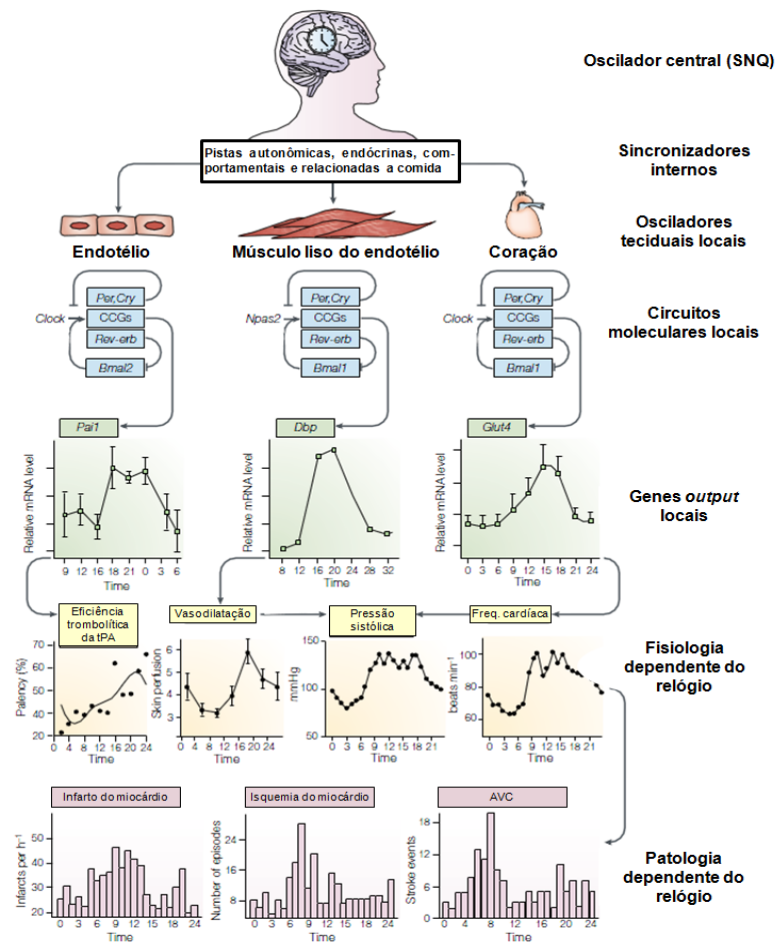


**Figura 2: Relógio molecular composto por circuitos interligados de retroalimentação**

Fonte: adaptado de McClung, 2013

A sincronização do NSQ depende da comunicação entre a região ventrolateral, responsável pelo recebimento dos sinais fóticos, e a região dorsomedial, não responsiva a luz: quando sincronizado, existe no NSQ uma relação de fase entre estas duas subregiões. Mudanças abruptas nos ciclos claro/escuro rapidamente alteram a atividade elétrica e expressão dos ‘genes relógio’ no NSQ ventrolateral. Por outro lado, o NSQ dorsomedial leva uma quantidade de ciclos para alterar a fase após a alteração ambiental (Gu *et al.*, 2012; Nagano *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2005). Esta dessincronização transitente entre as duas

regiões provoca uma dessincronização entre o ciclo claro/escuro e certos ‘outputs’ fisiológicos, como, por exemplo, os ritmos de temperatura e de produção de melatonina (Cambras *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2009). Além disso, considerando que o NSQ é o marcapasso, este sincroniza os osciladores periféricos (Figura 3) através de sinalização neuronal e humoral e, em uma situação de alteração dos ciclos claro/escuro, uma dessincronia entre o NSQ e os demais osciladores também ocorre. Cada oscilador periférico tem um tempo específico para resincronizar os genes relógio, provavelmente em função das diferentes vias responsáveis pela comunicação entre estes e o NSQ. Foi observado que o NSQ, como esperado, é o tecido mais rápido a resincronizar a expressão de *Per* (Yamazaki *et al.*, 2000).



**Figura 3: Osciladores periféricos.** Exemplo na fisiologia e doença cardíaca  
Fonte: Adaptado de Hastings *et al.*, 2003

Considerando a plasticidade inerente a um sistema em constante adaptação, não é surpreendente que uma série de estudos confirme a presença de receptores glutamatérgicos no NSQ. Juntamente com outros neurotransmissores, o glutamato está envolvido no reinício de fase do NSQ, principalmente via ativação de receptores ionotrópicos (iGluR): N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e de cainato (Chen & van den Pol, 1998; Ebling, 1996; Gannon & Rea, 1994; Michel *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 1995). O bloqueio destes receptores por antagonistas específicos previne as alterações de fase de atividade e de atividade elétrica induzidas pela luz (Colwell & Menaker, 1992; Ding *et al.*, 1994), enquanto a ativação *in vivo* de NMDA e AMPA no NSQ leva à alterações de fase semelhantes às induzidas pela luz (Mintz *et al.*, 1999; Mizoro *et al.*, 2010). Além dos iGluR, os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) também estão envolvidos. Existe uma interação complexa entre estes dois tipos de receptores e tem sido sugerindo que os mGluR tem papel modulador (Haak, 1999; Haak *et al.*, 2006).

Outro neurotransmissor com papel relevante na manutenção de ritmos é a noradrenalina (NA). Nos pinealócitos, a NA se liga a receptores  $\beta$ -adrenérgicos ativando a adenilato-ciclase e aumentando AMPc, que por sua vez estimula a atividade da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), passo limitante da rota sintética de melatonina. Na presença da luz, através de projeção polisinápticas, o NSQ inibe a atividade das vias simpáticas que fornecem NA para a pineal e este circuito determina que a luz suprima a produção e liberação de melatonina (Markus *et al.*, 2007; Pandi-Perumal *et al.*, 2006).

Ilustrando a complexidade da neurotransmissão no NSQ, neuropeptídeo Y (NPY), serotonina e ácido gama aminobutírico (GABA) são mediadores do trato geniculohipotalâmico e projeções dos núcleos da rafe através das quais sinais não-fóticos relevantes para marcação e alteração de ritmos são retransmitidos ao NSQ (Figura 1).

## 1.2. Sistema circadiano e estados patológicos

A habilidade de prever alterações repetitivas (ciclos) do ambiente para otimizar a coleta, armazenamento e gasto de energia é essencial para a sobrevivência dos organismos. Da mesma forma, a capacidade de responder e se adaptar a mudanças destes ciclos padrões são igualmente importantes para a sobrevivência (Karatsoreos, 2012). O sistema circadiano confere ritmos ao organismo e permite que estes sejam alterados conforme as alterações no ambiente (Figura 3). Porém, estímulos externos (como a exposição à luz durante a noite) podem desencadear o processo de ressincronização de forma constante e contínua, o que não deveria ocorrer nas circunstâncias naturais para as quais o organismo está preparado.

Seres humanos tendem a ser ativos durante o dia e a descansar à noite. Entretanto, as preferências de horário variam de pessoa para pessoa e, mesmo em diferentes estágios da vida, no mesmo indivíduo (Eisenstein, 2013; de Souza & Hidalgo, 2013). Além disso, em mamíferos, outros estímulos (temperatura, atividades sociais) além da luz podem servir como zeitgebers, ou seja, podem encarrilhar ou sincronizar o ritmo interno ao do meio ambiente (Lall *et al.*, 2012). Com as possibilidades proporcionadas pela luz artificial, o aumento da atividade comercial e social noturna e a necessidade de trabalhadores em todos os turnos, os seres humanos se tornaram a primeira espécie a não moldar suas rotinas conforme as transições dia-noite, não permitindo que seus processos fisiológicos e comportamentais sincronizem com a fase (dia ou noite) preferencial. Por exemplo, como visto acima, a ausência de luz é necessária para a produção de melatonina, por sua vez um importante marcador de ritmo.

Acumulam-se evidências que apontam para o fato de que alterações no sistema circadiano contribuem na etiologia de uma série de estados patológicos, incluindo doenças metabólicas e câncer (Bittencourt *et al.*, 2010; Haus & Smolensky, 2006; Roenneberg *et al.*, 2012), o que não é surpreendente considerando o papel regulatório e a ubiquidade do sistema

circadiano. Estudos indicam que o trabalho de turno está associado com transtornos gastrointestinais (Knutsson & Bøggild, 2010). A prevalência de doenças gastrointestinais (Koller, 1983) e de alteração funcional da bexiga (Zhen Lu *et al.*, 2006) aparentemente são mais comuns em trabalhadores submetidos a escalas de trabalho variável do que nos demais trabalhadores. Trabalhadores submetidos a turnos variáveis infectados por *Helicobacter pylori* também têm maior prevalência de úlcera péptica do que trabalhadores comuns (turnos constantes) também infectados (Pietrojusti *et al.*, 2006).

A facilidade de viagens transmeridionais faz com que pessoas tenham de se adaptar a fusos horários diferentes numa velocidade nunca antes experimentada; provavelmente, a consequência disso - o 'jet lag', seja a manifestação da ruptura ou dessincronização circadiana mais conhecida. Os sintomas que seguem incluem: fadiga, insônia, perda de apetite, prejuízo da coordenação motora e humor deprimido (Srinivasan *et al.*, 2010). Constatou-se que funcionários de empresas aéreas, com cinco anos de serviço e com menos tempo de recuperação após viagens transmeridionais, apresentam redução de volume do lobo temporal e déficits de memória e aprendizado correlacionadas às prolongadas elevações de cortisol associadas à exposição crônica ao 'jet lag' (Cho, 2001; Cho *et al.*, 2000). Derivado desta diferença de fusos, Roenneberg cunhou outro fenômeno denominado 'social jet lag', conceito que define a discrepância que frequentemente surge entre os relógios endógenos e sociais, quantificado através da diferença do ponto médio de sono entre dias livres e dias de trabalho (Roenneberg *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos também associam a curta duração de sono e ruptura circadiana com risco aumentado para síndrome metabólica e diabetes. Em ambiente controlado, indivíduos submetidos à privação de sono e ruptura circadiana concomitante, apresentaram taxa metabólica reduzida e concentração plasmática de glicose aumentada após refeição, indicando que tais condições aumentariam o risco para diabetes (Buxton *et al.*,



2012). Segundo recente estudo, o tempo de duração do sono está correlacionado com o índice de massa corporal, sendo que um sono mais longo diminui a probabilidade de sobrepeso (Roenneberg *et al.*, 2012). Mais do que a privação de sono, Ronneberg *et al.* (2012) demonstraram que o ‘*jet lag social*’ também aumenta significativamente a probabilidade de sobrepeso. O ‘*jet lag social*’ também está associado a maior prevalência de sintomas depressivos (Levandovski *et al.*, 2011).

Outro exemplo bem conhecido da influência dos ritmos no humor é a depressão sazonal. Muitos indivíduos passam por alterações sazonais fisiológicas, como de humor e de hábitos diários, que não se caracterizam como anormalidades. É preciso, portanto, avaliar se essas variações são suficientes para preencher os critérios de episódio de depressão maior (Monteleone & Maj, 2008). No entanto, o padrão sazonal é atualmente considerado um especificador da depressão recorrente, que apresenta recuperação entre os episódios (DSM-V). Em geral, os indivíduos com depressão sazonal sofrem com os dias mais curtos no outono e no inverno. Pacientes de depressão sazonal apresentam alterações nos padrões de secreção de cortisol e melatonina e no ritmo de temperatura (Avery *et al.*, 1997; Lewy *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 1997).

As associações entre problemas de saúde, padrões de comportamento e alterações de ritmo justificam a necessidade de uma melhor compreensão do papel dos ritmos na manutenção da normalidade fisiológica e em estados patológicos. Considera-se a possibilidade de que as consequências agudas da dessincronização possam funcionar como gatilho no desencadeamento de doenças em indivíduos susceptíveis.

### **1.2.1. Sistema circadiano e transtornos do SNC**

A oscilação rítmica da expressão dos genes relógio descrita na seção 1.1 também ocorre em diferentes estruturas do encéfalo e acredita-se que a atividade sincronizada destes

osciladores seja crucial para a saúde mental (Kondratova & Kondratov, 2012). A ruptura circadiana e a perda de qualidade de sono são características comuns em transtornos psiquiátricos. Apesar desta associação ser conhecida há muito tempo, não existem conclusões definitivas quanto à relação causa-efeito entre rupturas de ritmo e alterações da função cerebral. A identificação de polimorfismos em genes responsáveis pela geração de ritmos e envolvidos em doenças neurológicas e o fato de neurotransmissores apresentarem modulação circadiana são argumentos para que se atribua um papel mais central à ruptura circadiana nas doenças neuropsiquiátricas (Frank *et al.*, 2013).

### *Cognição*

O desempenho cognitivo também é uma função dependente da sincronização interna dos relógios presentes no sistema nervoso central. Karatsoreos et al (2011), utilizando um protocolo de exposição a ciclo de luz alterado, demonstraram que a ruptura de ritmos circadianos provoca alterações no remodelamento dos neurônios do córtex pré-frontal medial e diminuição da flexibilidade cognitiva em camundongos. Indivíduos que não apresentam sincronia entre seu tempo interno e o ritmo de sono e vigília apresentam prejuízo no aprendizado (Wright *et al.*, 2006). Além disso, sugere-se que a dessincronização entre os relógios do cérebro pode contribuir para os desajustes cognitivos e emocionais no Alzheimer (Cermakian *et al.*, 2011).

### *Esquizofrenia*

Pacientes com esquizofrenia apresentam ritmo de monoaminas, de prolactina, de melatonina e de sono/vigília irregulares (Martin *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 1994; Wirz-Justice *et al.*, 1997). Alguns estudos associam polimorfismos e alterações na expressão gênica de genes relógios à esquizofrenia (Aston *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2013). Wulff *et al.* (2012), comparando pacientes com esquizofrenia a controles, relatou que a principal diferença do primeiro grupo em relação ao segundo é que metade dos indivíduos deste

apresentavam ritmos de sono/vigília e melatonina atrasados ou em livre curso, ou seja, desalinhados em relação aos ciclos externos de claro/escuro.

### *Ansiedade*

Apesar da associação entre distúrbios do sono e ansiedade ser bem conhecida, a relação causa-efeito entre ambas é ignorada. Sabe-se que a insônia predispõe os indivíduos à ansiedade e a perturbação do sono aumenta a probabilidade de pânico. Por outro lado, pacientes de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo apresentam frequentemente dificuldade em iniciar o sono (Wulff *et al.*, 2010). Por esta razão, no momento do diagnóstico se torna complicado diferenciar transtornos de ansiedade e síndrome do atraso de fase do sono.

De Bundel *et al.* (2013) observaram em um modelo de ruptura circadiana genética que camundongos com os genes *Cry 1* e *2* silenciados apresentaram comportamentos tipo-ansiedade elevados nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevada em relação aos seus controles selvagens.

### *Transtorno bipolar*

No transtorno bipolar, alterações de amplitude e fase foram descritas. Pacientes eutímicos apresentam instabilidade de ritmos e amplitudes diminuídas (Jones *et al.*, 2005; McCarthy & Welsh, 2012; Yang *et al.*, 2009). Anormalidades em ritmos de sono/vigília e ritmos sociais são características dos episódios de depressão e mania, sendo que problemas de sono frequentemente precedem relapsos (Boivin, 2000; McClung, 2007). Camundongos mutantes de *CLOCK* apresentam fenótipo de mania caracterizado por hiperatividade, diminuição do sono, comportamento tipo-depressivo e ansiedade reduzida. Muitos destes comportamentos são revertidos pelo tratamento com lítio (Jagannath *et al.*, 2013; Roybal *et al.*, 2007).

## *Depressão*

A teoria do *zeitgeber* social que contribui no desencadeamento da depressão, proposta por Ehlers et al (1988), sugere que eventos da vida, especialmente os estressantes, provocam ruptura dos ciclos circadianos, desencarrilhando o relógio interno e levando a episódios depressivos em indivíduos suscetíveis (McClung, 2011). Anormalidades em fase e amplitude dos ritmos circadianos são descritas em pacientes deprimidos (Tsujimoto *et al.*, 1990). Também são relatadas alterações nos padrões de secreção de melatonina, cortisol, norepinefrina e prolactina (Koenigsberg *et al.*, 2004). Achados indicam que polimorfismos nos genes relógio RORA e *Cry-1* estão associados à depressão (Lavebratt *et al.*, 2010; Partonen, 2012; Soria *et al.*, 2010). Em camundongos submetidos a estresse crônico social, apenas aqueles que desenvolveram fenótipo tipo-depressivo apresentaram alteração nos ritmos de temperatura, sugerindo que a mesma está envolvida no desenvolvimento deste comportamento (Krishnan *et al.*, 2007).

Uma vez que pelo menos um subgrupo de pacientes deprimidos apresenta ruptura de ritmicidade, é possível especular que tratamentos que restaurem os ritmos internos amenizariam estados depressivos (Monteleone & Maj, 2008). Na realidade, já há evidências da associação entre efeitos antidepressivos e ritmos circadianos. A melatonina, um neuro-hormônio sintetizado durante a noite e que apresenta papel regulatório de ritmos circadianos, mostra ação antidepressiva em modelos animais (Mantovani et al, 2003; Ergün et al, 2006; Detanico et al, 2009). Há ainda sugestão de que metabólitos de melatonina (e.g.6-sulfatoximelatonina) possam servir de marcadores para subgrupos de pacientes que responderão a determinados antidepressivos (Hidalgo *et al.*, 2011). Principalmente em função dos necessários cuidados com princípios éticos em estudos em humanos e da dificuldade de se modelar estados depressivos em animais, os efeitos de antidepressivos, especialmente nos ritmos circadianos, não estão claramente determinados. Considerando o papel fundamental da

manutenção dos ritmos para um organismo saudável, a compreensão de alterações provocadas pelos medicamentos nesse sentido se torna importante.

Apesar dos estudos sobre ruptura circadiana estarem em crescimento, o número de estudos sobre o desalinhamento de ritmos ainda é pequeno quando comparado aos estudos de privação de sono. A associação entre privação de sono/ruptura circadiana e estados patológicos chama a atenção para a importância do estudo da Cronobiologia e de estratégias que minimizem os efeitos das alterações do sistema circadiano na saúde e bem-estar.

### **1.3. N-acetilcisteína em transtornos psiquiátricos**

Em todas as condições psiquiátricas listadas acima há evidências significativas do papel dos distúrbios de ritmos como fator contribuinte ou desencadeante em indivíduos sensíveis. Curiosamente, não existe para nenhum desses transtornos tratamento farmacológico considerado adequado. Déficits cognitivos tem tratamento limitado, tanto em termos de eficácia quanto de efeitos adversos, e é o sintoma para o qual os medicamentos usados em esquizofrenia tem efeito mais limitado (Keefe *et al.*, 2007). Distúrbios de ansiedade e transtorno bipolar tem curso recidivante e, mesmo possuindo uma variedade de drogas disponíveis, estas também apresentam eficácia limitada e uma gama de efeitos adversos importantes. O caso da depressão é talvez o mais grave, considerando que, de acordo com a organização mundial da saúde (OMS), são cerca de 121 milhões de pessoas diagnosticadas com depressão em todo mundo, o que representa aproximadamente 17% da população. Ela ocupa o terceiro no lugar no ranking das doenças com maior perda de anos de vida devido à qualidade menor de saúde e/ou à mortalidade prematura (World Health Organization, 2008).

Na busca de inovação em termos de tratamento farmacológico para estas patologias, o papel do glutamato tem sido o foco da última década, uma vez que alterações do sistema glutamatérgico foram associadas à patofisiologia de uma série de transtornos de humor,

incluindo depressão (Sanacora *et al.*, 2008, 2012). Dessa maneira, é intensificada a busca por agentes moduladores da função glutamatérgica que apresentam perfil diferente dos agentes conhecidos, em muitos casos eficazes, mas com uso limitado pela indução de efeitos adversos importantes. Um modulador glutamatérgico com surpreendentes efeitos psicofarmacológicos é a N-acetilcisteína (NAC) (Berk *et al.*, 2013). A NAC é utilizada em casos de intoxicação por paracetamol há mais de 30 anos, com perfil de segurança mais que estabelecido. Outra aplicação tradicional é como agente mucolítico, principalmente em casos de doença pulmonar obstrutiva crônica, embora com eficácia questionável.

NAC é um antioxidante eficaz, e alterações do estado redox tem sido correlacionadas com vários transtornos psiquiátricos, incluindo depressão e esquizofrenia. A NAC fornece cisteína, substrato para a síntese de glutatona e ainda diminui os níveis de citocinas inflamatórias. Quanto ao sistema glutamatérgico, NAC provoca um aumento na atividade do antiporter cistina-glutamato, presente principalmente em células gliais, o que resulta em maior liberação de glutamato para o meio extracelular. Este aumento extracelular leva a maior ativação de receptores metabotrópicos extra sinápticos de glutamato que, por sua vez, inibem a liberação sináptica de glutamato e a consequente ativação de seus receptores pós sinápticos (incluindo NMDA e AMPA). Foi demonstrado que NAC promove a neurogênese diretamente, através do aumento de proteínas neuroprotetoras e indiretamente, pelo aumento de proteínas antiapoptóticas (Dean *et al.*, 2011).

Provas clínicas sugerem que o tratamento com NAC traz benefícios em pacientes de transtorno bipolar (Berk *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2011), esquizofrenia (Bulut *et al.*, 2009; Lavoie *et al.*, 2008), transtorno obsessivo-compulsivo (Lafleur *et al.*, 2006) e tricotilomania (Grant *et al.*, 2009; Odlaug & Grant, 2007). Há ainda um relato de caso de jovem apresentando transtorno de ansiedade generalizada e fobia social, para o qual o tratamento adjunto com NAC provocou melhoras significativas dos sintomas de ansiedade,

incluindo da insônia relacionada à mesma (Strawn & Saldaña, 2012). Este efeito universal de NAC numa diversidade de transtornos sustenta a hipótese de atuação em vias *downstream* comuns a estes transtornos. Assim como estresse oxidativo, inflamação e alterações em neurotransmissores (especialmente glutamato), alterações de ritmos também são descritas em pacientes psiquiátricos. Considerando a modulação glutamatérgica exercida por NAC e o papel dos receptores glutamatérgicos no NSQ, este estudo explora a hipótese de que NAC atue sobre a dessincronização circadiana e/ou seus efeitos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar o efeito da imipramina e da N-acetilcisteína em um modelo de ruptura de ritmo em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

1) Verificar alterações de ritmo de temperatura provocadas por ciclos claro/escuro de 20 h (10:10 h claro/escuro) nas linhagens BALB/c, C57BL6/N e CF1;

2) Verificar alterações nas amplitudes de atividade e temperatura provocadas por ciclos claro/escuro de 20 h em camundongos BALB/c;

3) Verificar o efeito de ciclos claro/escuro de 20 h no teste de Placa Perfurada (hole-board) em camundongos BALB/c;

4) Verificar o efeito de ciclos claro/escuro de 20 h no teste de Preferência Social em camundongos BALB/c;

5) Verificar o efeito de ciclos claro/escuro de 20 h nos níveis plasmáticos de corticosterona e interleucina-6 em camundongos BALB/c;

6) Verificar o efeito da imipramina nas alterações induzidas por ciclos claro/escuro de 20 h em camundongos BALB/c, conforme detalhado em 2-5;

7) Verificar o efeito da N-acetilcisteína nas alterações induzidas por ciclos claro/escuro de 20 h em camundongos BALB/c, conforme detalhado em 2-5.



### 3. CAPÍTULO I

## **Differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6N and CF1 mouse strains to changes in photoperiod**

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Neuroscience Methods

Obs: As legendas acompanham as figuras para facilitar a visualização.

**Differential susceptibility of BALB/c, C57BL/6N and CF1 mouse strains to changes in photoperiod**

Luísa K. Pilz<sup>1,2</sup>, Caroline L. Quiles<sup>3</sup>, Eliane Dallegrave<sup>4</sup>, Rosa Levandovski<sup>3,5</sup>, Maria Paz L. Hidalgo<sup>3,5\*</sup>, Elaine Elisabetsky<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica; <sup>3</sup>Laboratório de Cronobiologia HCPA/UFRGS, Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal, <sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author:*

Luísa K. Pilz, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone/Fax: +55 51 33083121.

E-mail address: [luisakp@gmail.com](mailto:luisakp@gmail.com)

## **Abstract**

The disruption of circadian rhythms has been associated with a variety of health issues, including metabolic and mood disorders. The availability of methods to evaluate causal, trigger or confounding roles for desynchronization is therefore relevant to experimental psychopharmacology. Specifically, animal models that mimic the circadian disturbances of modern lifestyles would be useful in translational research applied to depressive disorders. The aim of this study was to verify the responsiveness of BALB/c, C57BL/6N, and CF1 mice to changes in photoperiod. Daily temperature rhythms were characterized using ThermoChron iButtons implanted in the mouse abdomen. Mice were maintained under 12:12 h light/dark (LD) cycles for 15 days, followed by 10:10 h LD cycles for 10 days. Cosinor and Rayleigh z tests, periodograms, and Fourier analysis were used to analyze rhythm parameters. Student's paired *t* test was used to compare temperature amplitude, the period and power of the first harmonic for each strain under normal and shortened cycles. The shortened LD cycle induced significant changes in temperature acrophases and rhythm amplitude in all mouse strains, although BALB/c was the only strain in which the period was significantly altered. A circadian disruption of core temperature, a precise and robust measure, was successfully documented in untethered mice, consisting in a useful parameter for evaluating desynchronization from other established rhythm measurements. We suggest that BALB/c mice are preferred for stress-induced models of depression, and the present data suggest that this strain should also be favored for experiments designed to explore the links between circadian rhythms and mood.

*Keywords:* circadian disruption, core body temperature rhythm, CF1, BALB/c and C57BL/6 mice.

**Highlights**

- Temperature rhythms can be characterized with iButtons implanted in the mouse abdomen
- BALB/c, C57BL/6N, and CF1 mice vary in responsiveness to photoperiod changes
- Photoperiod modification induced changes in rhythm parameters in all mouse strains studied
- BALB/c is the only strain in which the period was significantly altered
- BALB/c mice should be favored for modeling rhythm disruption as a risk factor in mood disorders

## 1. Introduction

A significant number of biological processes other than the sleep/wake cycle follow circadian rhythms. Because central and peripheral oscillators (respectively found in the suprachiasmatic nucleus in mammals and in organs including the spleen and lungs) differentially adapt to environmental changes, there can be desynchronization between rhythms (Reppert and Weaver, 2002; Nagano et al., 2003). Changes in rhythmicity, such as those induced by jet lag or job schedules, have been shown to result in or contribute to reduced metabolic efficiency, disorganization of metabolic and endocrine rhythms (Haus and Smolensky, 2006), increased susceptibility to gastrointestinal disorders (Knutsson and Bøggild, 2010), obesity and diabetes (Buxton et al., 2012), decreased fertility and increased risk for some forms of cancer (Stevens et al., 2011). The evidence that circadian desynchronization is associated with a variety of health issues, along with the recently identified changes in clock genes and their transcriptional regulators (Partonen, 2012; O'Neill et al., 2013), underscore the importance of further understanding human biological rhythms and the effects of desynchronization on specific disorders. Of particular interest to this study are the connections between disturbances in circadian rhythms and sleep and neuropsychiatric disorders, including schizophrenia, bipolar disorder and major depression (Hasler et al., 2010; Jagannath et al., 2013).

Translational research calls for animal models that employ known etiological and risk factors resulting in measurable behavioral and/or physiological alterations, preferably homologous to the human disease of interest. Mice are extensively used for behavioral research, both for predicting psychoactive properties of molecular entities in R&D drug programs and for understanding the pathophysiology of CNS disorders (Geyer, 2008; Belzung and Lemoine, 2011; Berton et al., 2012). Despite differences in endogenous periods among

species, rodent models can also be used to assess the effects of rhythm disruption on behavior and physiology (Nagano et al., 2003; Salgado-Delgado et al., 2010; Karatsoreos et al., 2011).

Body temperature can be influenced by external and internal signals. Because core temperature rhythmicity is less susceptible to change than the sleep/wake cycle, it is often used as a 'marker rhythm', providing a reference point against which other rhythms can be tested for (de)synchronization (Kelly, 2006). To incorporate changes in circadian rhythms in the experimental modeling of mental disorders, the present study was designed to compare the susceptibility of commonly used mouse strains (CF1, BALB/c and C57BL/6N) to changes in photoperiod as assessed by continuous body core temperature recordings.

## **2. Material and Methods**

*2.1. Animals:* Experiments were performed with CF1, BALB/c and C57BL/6N male 2-month-old mice obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Mice were housed in our own animal facility under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 h-light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) for two weeks before the experiments. All procedures were carried out according to institutional policies on the handling of experimental animals. The project was approved by the University Ethics Committee (approval # 22308).

*2.2. iButtons:* ThermoChron iButtons (Dallas Semiconductor, Dallas, TX) were used to record and store time and temperature data. Each iButton weighs approximately 3.5 g and has a diameter of 17.5 mm. For the purposes of this study, iButtons were programmed to record core body temperature every 30 min for 29 consecutive days.

*2.3. Surgery:* An iButton was implanted into the abdominal cavity of each mouse. The animals were anesthetized with i.p. ketamine/xylazine (Cetamin®/Xilazin® Syntec SP Brazil,

100/10 mg/kg for CF1; 70/7 mg/kg for BALB/c and C57BL/6N strains). The fur of the abdomen was shaved, and the region was cleaned with 70% alcohol. A longitudinal incision of approximately 2 cm was made along the midline, and the iButton, previously cleaned with 70% alcohol, was inserted into the abdominal cavity. The suture was made with 4-0 nylon threads. Animals were kept warm until they recovered from the anesthesia. Tramadol (Tramal® Hipolabor MG Brazil, 1 mg/kg) was subcutaneously administered immediately after surgery and the day after surgery. Animals were singly housed after the surgery until the end of the experiment. Animals were euthanized by cervical dislocation, and the iButtons were removed.

*2.4. Photoperiod Manipulation:* After surgery, animals were maintained under the usual 12:12 h light/dark (LD) cycle for 19 days (the first 4 days of recordings were considered as recovery time and were discarded), followed by 10:10 h short LD for 10 days.  $n = 5/\text{strain}$ .

*2.5. Locomotion:* Locomotion was assessed between 14 h and 16 h before and 10 days after surgery using activity cages (45 x 25 x 20 cm, Albarsch Electronic Equipments, Porto Alegre, Brazil) equipped with four parallel photocells. The number of crossings was recorded for 15 min, with the first 5 min considered to be exploratory behavior and the final 10 min considered to be locomotion (Linck et al., 2009).

*2.6. Data treatment and Statistical analysis:* To calculate the temperature rhythm parameters (amplitude and acrophases) for each group of mice, data were assessed using the Cosinor test. The acrophase of each group was analyzed using the Rayleigh z test in relation to individual vectors to determine the average vector of each group. Periodograms were used to evaluate the period of statistically significant oscillations. Fourier analysis was used to determine the power of the first harmonic. El Temps software (©Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Spain) was used for the rhythmic analysis.

The mean differences in temperature rhythm amplitude and period during exposure to 12:12 and 10:10 h LD cycles and locomotion before and after surgery were tested by paired Student's *t* tests. ANOVA, followed by SNK, was used for comparing group differences. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ , with a two-tailed hypothesis. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 for Windows and SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### 3. Results

Figure 1 shows the raw temperature data obtained during the 12:12 h and 10:10 h LD cycles for each strain group.

As seen in Figure 2, the shortened 10:10 h LD cycle induced a clear delay in acrophases and significant decrease in temperature rhythm amplitudes in all three mouse strains ( $t_4=8.05$ ,  $p<0.001$ ,  $t_4=15.64$ ,  $p<0.001$ ,  $t_4=4.89$ ,  $p<0.01$ , for BALB/c, C57BL/6N and CF1, respectively). The results of the ANOVA followed by SNK indicate that BALB/c mice showed significantly higher amplitudes in both normal and shortened cycles compared with the other two strains ( $F_{2,12}=6.37$ ,  $p<0.05$ ;  $F_{2,12}=29.07$ ,  $p<0.01$ , 12:12 h LD and 10:10 h LD, respectively).

Individual periodograms (Figure 3A) show large peaks at 1440 min (or 24 h) when animals were under 12:12 h LD cycles. Under 10:10 h LD cycles, the main peaks were weakened, and other peaks eventually emerged. Fourier analysis (Figure 3B) confirms significant changes in the power of first harmonics for each strain ( $t_4=6.53$ ,  $p<0.01$ ,  $t_4=13.88$ ,  $p<0.001$ ,  $t_4=4.0$ ,  $p<0.05$ , for BALB/c, C57BL/6N and CF1, respectively). Comparison of normal and shortened cycles with *t* tests show that BALB/c was the only strain presenting a statistically significant ( $t_4=12.37$ ,  $p<0.001$ ,  $t_4=1.55$ ,  $p>0.05$ ,  $t_4=0.47$ ,  $p>0.05$ , for BALB/c,



C57BL/6N and CF1, respectively) change in period (Figure 3C). As expected, data from the CF1 strain show the largest variability.

#### **4. Discussion**

This study shows that these mouse strains are susceptible to photoperiod changes. The three strains presented a delayed rhythm of temperature acrophase; as expected, acrophases obtained from the inbred BALB/c and C57BL/6N strains were more homogeneous than those obtained from the outbred CF1 mice. Changes in the LD cycle decreased the robustness of temperature rhythms, with every mouse strain showing reduced amplitude under the short 10:10 h cycle. Consistent with Conolly and Lynch (1981), the highest amplitude was found in the BALB/c strain; our data show that the higher amplitude in BALB/c mice was maintained after LD changes. This study is relevant to the use of mouse models in the study of rhythm disruption because it shows that BALB/c mice are particularly sensitive to photoperiod changes. These mice showed the most pronounced shift delay, being the only strain in which the period of the temperature rhythm was significantly altered, while also showing homogeneous temperature amplitude and acrophase before and after the photoperiod was shortened.

BALB/c mice have been shown to be particularly sensitive to stress, and they present enhanced depression- and anxiety-related behaviors (Cryan and Holmes, 2005). Suggesting higher anxiety levels, the BALB/c strain showed higher plasma corticosterone in response to stress (Lu et al., 1998; Roy et al., 2007) and less exploratory behavior of new environments (Lepicard et al. 2000). It was reported that social aversion was prominently induced in BALB/c mice after social defeat stress (Razzoli et al., 2011). BALB/c mice, but not C57BL/6 mice, present deficits in spatial working memory and shifts in attention following infant maternal separation (Mehta and Schmauss, 2011). Unpredictable chronic mild stress induced

coat deterioration and decreased grooming in BALB/c mice but not in Swiss mice (Yalcin et al., 2008). It is therefore not surprising that BALB/c is the strain usually selected for studies in which stress plays a central role, such as studies on depression and/or the effects of antidepressants. Linking stress and rhythmicity, Takahashi et al. (2013) reported that after repeated stress, BALB/c mice but not C57BL/6 mice presented changes in corticosterone and insulin secretion rhythms, as well as changes in the circadian expression of liver clock genes. Our study suggests that the BALB/c strain is significantly sensitive to changes of rhythms even in the absence of stress; it would be interesting to see if changes of rhythm by itself lead to stress-related behavior.

Bright light therapy is suggested as treatment or adjunctive treatment to antidepressants for various forms of depression (Martiny et al., 2005; Hizli Sayar et al., 2013). The relevance of circadian rhythms in mood disorders (McClung, 2011; Jagannath et al., 2013), the intertwined effects of desynchronization and stress suggested by Wong & Schumann (2012), and the antidepressive-like effects of melatonin (Detanico et al., 2009) and agomelatin (Papp et al., 2003) in stress-induced rodent models of depression underscore the relevance of modeling desynchronization as a risk factor in mouse models of depression. For verifying desynchronization, temperature rhythm is a robust parameter to match with activity rhythms under cycles of light/dark exposure. Thermochron iButtons, data loggers that record time and temperature, were shown to successfully monitor core body temperature in rats (Davidson, 2003), and here, they were shown to be applicable to mice. Relevant to the accurate interpretation of data from behavioral models, no significant changes were seen in locomotion before and after iButtons were implanted. In comparison to the “gold standard” telemetry systems of continuous recording of temperature in free-moving laboratory rodents, iButtons avoid the high initial cost for set-up (Newsom et al., 2004).

Changes in body weight and cognitive deficits are among the symptoms commonly observed in patients affected with major depression. Interestingly, Karatsoreos et al. (2011) reported that C57BL/6 mice subjected to 10:10 h LD cycle showed altered body temperature rhythms, changes in metabolic hormones, accelerated weight gain, decreases in cognitive flexibility and remodeling of medial prefrontal cortex neurons. Adding to the proposition that this pattern of shortened cycle can be adopted as a model for circadian disruption, our data suggest that the use of this 10:10 h LD photoperiod pattern in models with BALB/c mice may be particularly useful for examining the links between rhythm disruption, stress and depression. In addition to the susceptibilities to both stress and photoperiod changes, the use of BALB/c mice for modeling the associations between rhythm disturbances and depression is facilitated by the large body of relevant available data, including responses to different antidepressants in both behavioral and neurochemical correlates (Dulawa et al., 2004; Yalcin et al., 2008; Surget et al., 2011).

## **5. Conclusion**

The experimental modeling of desynchronization as a given disorder risk factor of mental disorders requires the identification of suitable subjects that are both sensitive to rhythm disruption and accessible for the assessment of relevant changes. This study shows that BALB/c is the preferred strain for modeling the associations between rhythm disruptions and depression.

## **Acknowledgments**

The authors are thankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (L.K.P., C.L.Q. and E.E.) for fellowships. This study was supported by Rede Instituto Brasileiro de Neurociência IBN Net 01.06.0842-00 and PRONEX 10/0031-1.

## References

- Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 2011; 1 (1):9.
- Berton O, Hahn C-G, Thase ME. Are we getting closer to valid translational models for major depression? *Science.* 2012; 338 (6103):75–9.
- Buxton OM, Cain SW, O'Connor SP, Porter JH, Duffy JF, Wang W, et al. Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4 (129):129-43.
- Connolly MS, Lynch CB. Circadian variation of strain differences in body temperature and activity in mice. *Physiol. Behav.* 1981; 27(6):1045–9.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4(9):775–90.
- Davidson AJ, Aujard F, London B, Menaker M, Block GD. Thermochron ibuttons: an inexpensive method for long-term recording of core body temperature in untethered animals. *J Biol Rhythms.* 2003 Oct; 18(5):430–2.
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, et al. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 607(1-3):121–5.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2004; 29(7):1321–30.
- Geyer MA. Developing translational animal models for symptoms of schizophrenia or bipolar mania. *Neurotox. Res.* 2008; 14(1):71–8.
- Hasler BP, Buysse DJ, Kupfer DJ, Germain A. Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression. *Psychiatry Res.* 2010; 178(1):205–7.
- Haus E, Smolensky M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control Ccc.* 2006; 17(4):489–500.

Hizli Sayar G, Agargun, Tan, Bulut. Comparison of effects of bright light therapy alone or combined with fluoxetine on severity of depression, circadian rhythms, mood disturbance, and sleep quality, in patients with non-seasonal depression. *Chronophysiology Ther.* 2013; 53.

Jagannath A, Peirson SN, Foster RG. Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2013; 23.

Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011 Jan; 108(4):1657–62.

Kelly G. Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 2006; 11, 278–293.

Knutsson A, Bøggild H. Gastrointestinal disorders among shift workers. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 2010; 36(2):85–95.

Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I, Perez-Diaz F, Chapouthier G. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 67(4):739–48.

Linck VM, da Silva AL, Figueiró M, Piatto AL, Herrmann AP, Dupont Birck F, et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 2009; 16(4):303–7.

Lu ZW, Song C, Ravindran AV, Merali Z, Anisman H. Influence of a psychogenic and a neurogenic stressor on several indices of immune functioning in different strains of mice. *Brain. Behav. Immun.* 1998; 12(1):7–22.

Martiny K, Lunde M, Undén M, Dam H, Bech P. Adjunctive bright light in non-seasonal major depression: results from patient-reported symptom and well-being scales. *Acta Psychiatr. Scand.* 2005; 111(6):453–9.

McClung CA. Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre-clinical models. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2011; 21 Suppl 4:S683–693.

Mehta M, Schmauss C. Strain-specific cognitive deficits in adult mice exposed to early life stress. *Behav. Neurosci.* 2011; 125(1):29–36.

Nagano M, Adachi A, Nakahama K, Nakamura T, Tamada M, Meyer-Bernstein E, et al. An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2003; 23(14):6141–51.

Newsom DM, Bolgos GL, Colby L, Nemzek JA. Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. / Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2004; 43(5):13–8.

O'Neill JS, Maywood ES, Hastings MH. Cellular mechanisms of circadian pacemaking: beyond transcriptional loops. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2013; (217):67–103.

Papp M, Gruca P, Boyer P-A, Mocaër E. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 2003; 28(4):694–703.

Partonen T. Clock gene variants in mood and anxiety disorders. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996. 2012; 119(10):1133–45.

Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Ballottari A, Arban R. Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behav. Brain Res.* 2011; 216(1): 100–8.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002; 418(6901):935–41.

Roy V, Merali Z, Poulter MO, Anisman H. Anxiety responses, plasma corticosterone and central monoamine variations elicited by stressors in reactive and nonreactive mice and their reciprocal F1 hybrids. *Behav. Brain Res.* 2007; 185(1):49–58.

Salgado-Delgado R, Nadia S, Angeles-Castellanos M, Buijs RM, Escobar C. In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus. *J. Biol. Rhythms.* 2010; 25(6):421–31.

Stevens RG, Hansen J, Costa G, Haus E, Kauppinen T, Aronson KJ, et al. Considerations of circadian impact for defining “shift work” in cancer studies: IARC Working Group Report. *Occup. Environ. Med.* 2011; 68(2):154–62.

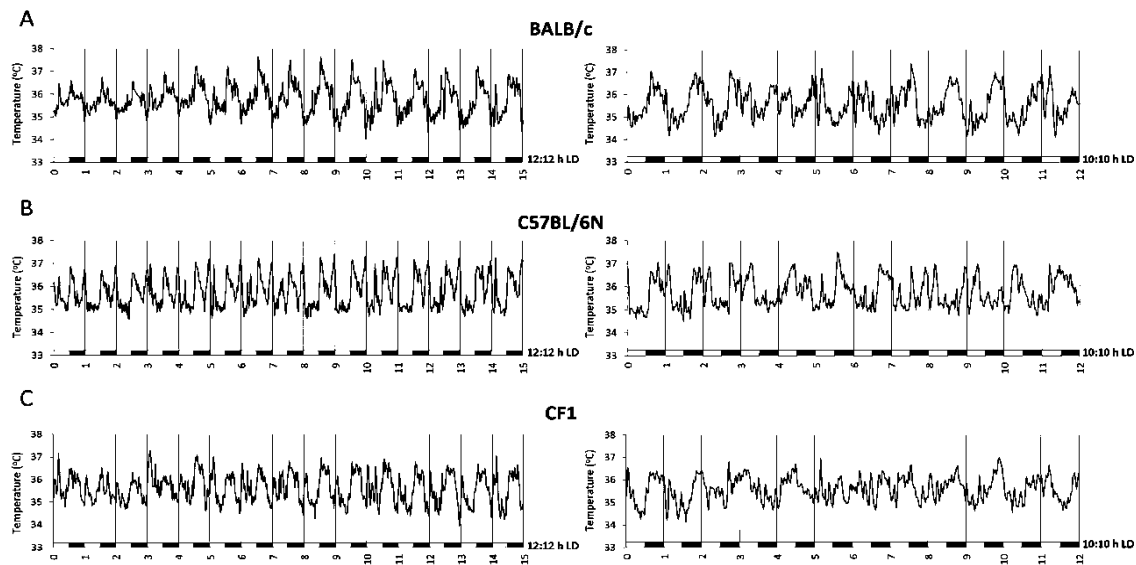
Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psychiatry.* 2011; 16(12):1177–88.

Takahashi K, Yamada T, Tsukita S, Kaneko K, Shirai Y, Munakata Y, et al. Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013; 304(3):E301–309.

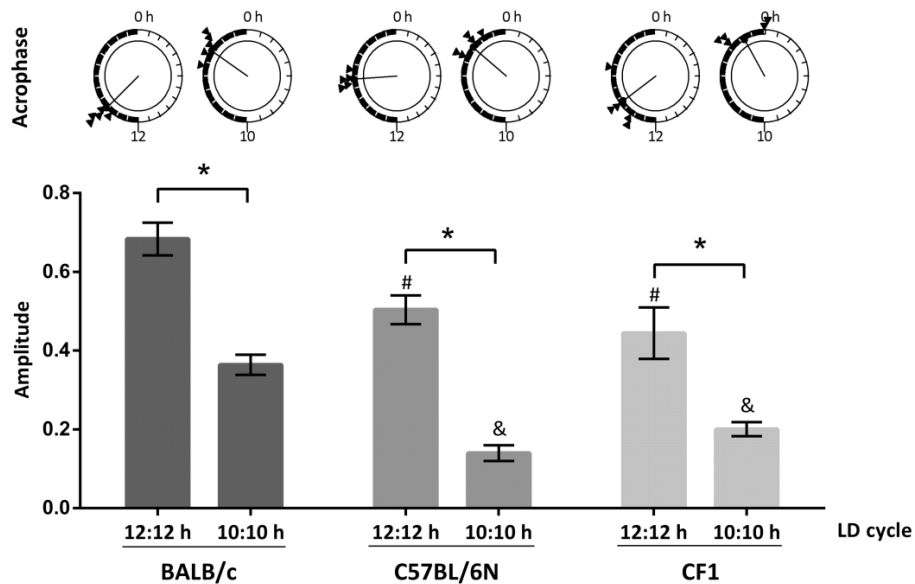
Wong CCP, Schumann G. Integration of the circadian and stress systems: influence of neuropeptides and implications for alcohol consumption. *J. Neural Transm.* 2012; 119(10):1111–20.

Yalcin I, Belzung C, Surget A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav. Brain Res.* 2008; 193(1):140–3.

## Legends

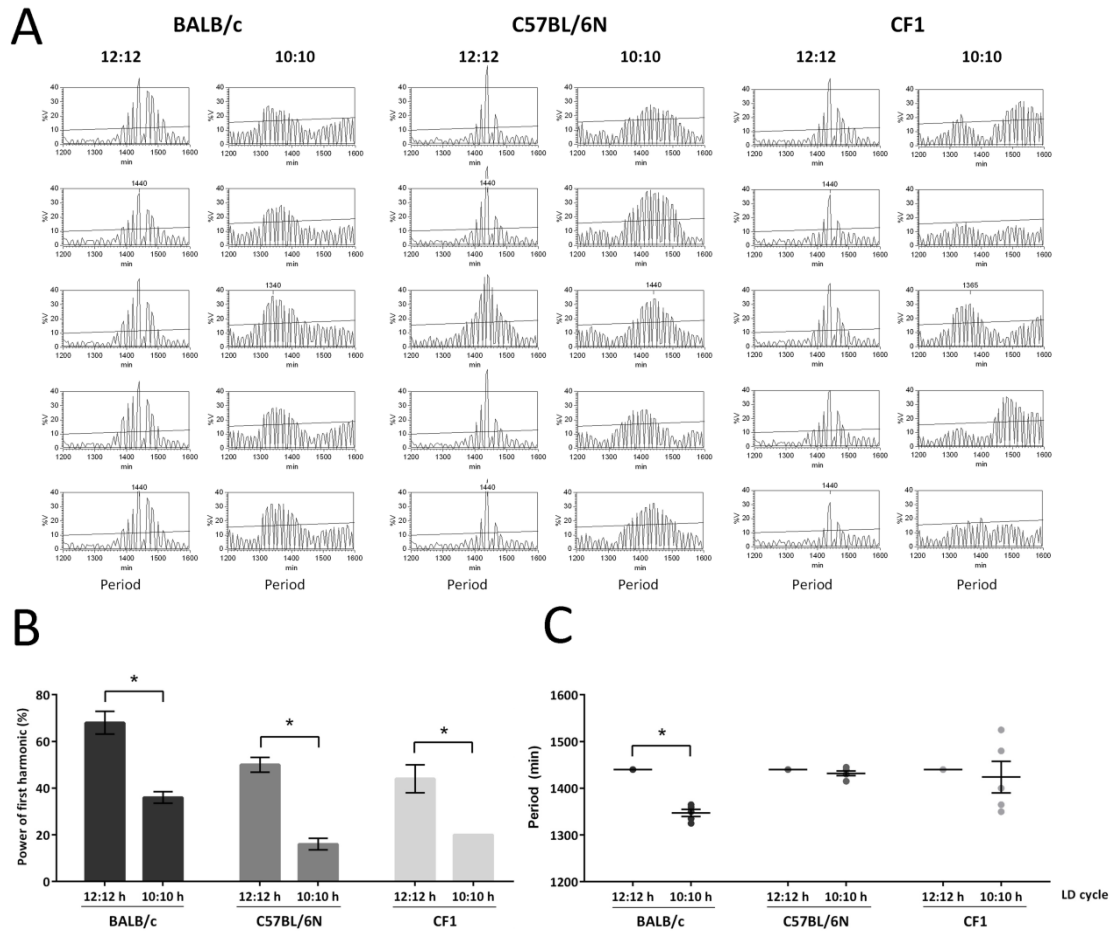


**Fig. 1: Temperature rhythms.** Raw temperature data collected from BALB/c (A), C57BL/6N (B) and CF1 (C) mice under 12:12 h and 10:10 h light/dark (LD) cycles.  $n=5$ . Dark bars at the bottom of each graph represent dark phases (lights off at 20h); numbers refers to LD cycles.



**Fig. 2: Acrophase and amplitude.** Temperature rhythm acrophase and amplitude from BALB/c, C57BL/6N and CF1 mice under 12:12 h and 10:10 h light/dark (LD) cycles.  $n = 5$ . Acrophases: Rayleigh test; hour 0 represents the moment when the lights were turned on. Amplitude: mean  $\pm$  SEM. \* $p < .01$ , Paired  $t$  test; # $p < .05$  compared to BALB/c 12:12 h, and & $p < .05$  compared to BALB/c 10:10 h, ANOVA/SNK.





**Fig. 3: Periodograms.** Temperature rhythms in BALB/c, C57BL/6N and CF1 mice under 12:12 h and 10:10 h LD cycles: individual periodograms (A), potency of the first harmonic (B), and period (C).  $n = 5$ . Mean  $\pm$  SEM. \* $p < .05$  compared to 12:12 h, Paired  $t$  test.

## 4. CAPÍTULO II

### **Effects of antidepressants on acute rhythm disruption in mice**

Artigo a ser submetido ao periódico Chronobiology International

Obs: As legendas acompanham as figuras para facilitar a visualização.

## Effects of antidepressants on acute rhythm disruption in mice

Luísa K. Pilz<sup>1,2</sup>, Yasmine Trojan<sup>1</sup>, Caroline Luísa Quiles<sup>3</sup>, Radharani Benvenuti<sup>1</sup>, Gabriela Melo<sup>1</sup>, Rosa Levandovski<sup>3,4</sup>, Maria Paz L. Hidalgo<sup>3,4</sup> and Elaine Elisabetsky<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Etnofarmacologia, Departamento de Farmacologia, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica; <sup>3</sup>Laboratório de Cronobiologia HCPA/UFRGS; Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal, <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Corresponding author:*

Luísa K. Pilz, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone/Fax: +55 51 33083121.

E-mail address: [luisakp@gmail.com](mailto:luisakp@gmail.com)

**Abstract**

Rhythm disruption is thought to be a risk factor for a range of diseases, including psychiatric conditions. Understanding the effects of acute rhythm disruption is relevant to explore its contribution for health disturbances, but animal studies on the acute effects of rhythm changes are lacking. The purpose of this study is to verify the effects of acute rhythm disruption in mice, including behavior, corticosterone and interleukin-6 (IL-6) analysis. Additionally, we investigated the effects of imipramine and N-acetylcysteine (NAC) in mice submitted to acute rhythm disruption. BALB/c mice were exposed to 10 cycles of 12:12 h light/dark (LD) followed by 7 or 13 cycles of 10:10 h LD. During the shorter LD period groups of mice were treated (i.p.) daily with imipramine (20 mg/kg) or NAC (30 or 60 mg/kg); the control group was maintained in 12:12 LD throughout the experiment. Circadian rhythms of rest/activity and temperature were assessed with iButtons and home cage actigraph. Behavioral tests (hole-board and social preference) were performed at the beginning of the experiment, and mice were retested at the 8<sup>th</sup> 10:10 LD. Plasma levels of corticosterone and IL-6 were assessed at 8<sup>th</sup> 10:10 LD. Actograms show that the 10:10 LD schedule prevents entrainment of temperature and activity rhythms for at least 13 cycles. Amplitudes of activity and temperature follow a similar pattern, with an initial decline after photoperiod change followed by attempts of recovering peaks roughly 5 cycles apart. Activity and temperature amplitudes are decreased during 10:10 LD (paired *t* tests), an effect exacerbated by imipramine at various times (one-way ANOVA/SNK). No significant effects of photoperiod or treatment were noted on test or retest performance in the hole-board; control mice showed significantly higher number of head-dips and shorter latency for the first head-dip at retest ( $p < 0.05$ , paired *t* test). The 10:10 LD schedule suppressed the decrease in anxiety observed at control retest, while NAC 30 mg/kg prevented the effect of rhythm change in anxiety. No significant differences were observed in social preference, corticosterone or IL-6 levels among groups. The reported

positive association between sleep/circadian disturbances and recurrence of depressive episodes underscores the clinical relevance of potential drug-induced maintenance of disturbed rhythms. Since rhythm robustness is reliably assessed by changes in amplitude, this study suggests that imipramine contributes to sustained disturbed rhythms after rhythm disruption. In contrast, NAC is devoid of effects in activity or temperature amplitude, and seem to prevent rhythm disruption-induced anxiety. The current experimental design allowed the identification of mild but significant behavioral changes in specific timing after acute photoperiod change. We suggest that subtle changes repeated over long enough periods may be a contributing factor to trigger permanent behavior disturbances relevant to anxiety and mood disorders, and that antidepressants should be carefully evaluated in this context.

*Keywords:* Circadian rhythm; glutamate, antidepressants, N-acetylcysteine, corticosterone, interleukin-6

## 1. Introduction

A growing body of data, ranging from molecular biology to epidemiology, illuminates the role of circadian rhythms in health and its disturbances in disease (Reppert & Weaver, 2002; Karatsoreos, 2012). Circadian rhythms are primarily determined by the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN is regulated by various neurotransmitters including glutamate, and ultimately through noradrenergic neurons determines the rhythmic release of pineal melatonin (Moore, 1997; Lall et al., 2012). Several genes and transcriptional factors have been identified as the molecular basis for a well-adjusted synchronicity among various bodily functions (Zheng et al., 1999; Grundschober et al., 2001; Reppert & Weaver, 2002; Sato et al., 2004), whereas specific mutations have been associated with increased prevalence of diverse maladies (Lavebratt et al., 2010; Sookoian et al., 2010; Dai et al., 2011; Partonen, 2012). Experimental data based on free running, constant desynchronization or chronic jet lag protocols provide relevant translational data on the physiological effects of rhythm disruption (Filipski et al., 2004; Aguzzi et al., 2006; Cambras et al., 2007; Casiraghi et al., 2012). Exploring the effects of acute rhythm desynchronization is relevant to understand how rhythms disruption can trigger health hazards, but animal studies on the acute effects of rhythm changes are lacking.

Among the most studied rhythms are the rest/activity rhythm and sleep. Mental conditions in which altered sleep patterns are substantial include various forms of anxiety, schizophrenia, bipolar and major depression (Wirz-Justice et al., 1997; Martin et al., 2001; McClung, 2007; Calandra et al., 2013). Further linking depression and sleep, antidepressive effects of melatonin and its analogs have been shown in animal models (Papp et al., 2003; Ergün et al., 2006; Detanico et al., 2009) and humans (Srinivasan et al., 2014), changes in melatonin metabolite (6-sulfathoxymelatonin) levels predict response outcome to nortryptiline (Hidalgo et al., 2011), and successful antidepressant treatment with various drugs normalizes plasma

melatonin levels (Carvalho et al., 2009). The prediction by the World Health Organization that major depressive will be first in the rank of disease burden by the year 2030 (World Health Organization, 2008), combined with the unacceptably poor outcome of antidepressive treatments reported in the STAR\*D study, boosted the search for newer antidepressive therapies (Sanacora et al., 2008). Following the interest raised by reports of the unique antidepressive pattern of sub anesthetic doses of ketamine, there is a great deal of research on glutamate modulators. N-acetylcysteine, a glutamate modulator devoid of the adverse effects common to most NMDA antagonists, have been reported to possess antidepressive-like effects in mice (Ferreira et al., 2008; Linck et al., 2012; Smaga et al., 2012; Costa-Campos et al., 2013) and in the depressive phase of bipolar patients (Berk et al., 2008). Anecdotal data suggest that restoring sleep patterns is a marked and instantaneous result of NAC in depressive patients.

The purpose of this study was to verify the effects of imipramine and NAC in acute rhythm disruption in mice. Circadian rhythms were characterized by rest/activity and temperature patterns. The effects of rhythm disruption and treatments were evaluated on behavior (hole-board and social preference tests) and plasma levels of corticosterone and interleukin-6.

## **2. Materials and Methods**

**2.1 Animals:** Adult (~50 days-old) male BALB/c mice were obtained from Universidade Federal de Pelotas, and acclimatized in groups of 4-6 for a week under controlled environmental conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 h-light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) in our animal facility (Unidade de Experimentação Animal-HCPA). Mice were transferred to the individual acrylic cages (20 x 23 x 23 cm) of the actigraph and kept under inverted LD cycles with lights on at 20:00 h for at least one week before surgery.

All procedures were carried out according to institutional policies on experimental animals handling. The project was approved by the Institutional Ethics Committee (#12-0059 GPPG/HCPA).

**2.2 Drugs:** N-acetylcysteine (NAC) and imipramine were acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). All drugs were solubilized in saline (NaCl 0.9%).

**2.3 Study design:** Figure 1 illustrates the study design. Animals were given at least 7 days to recover from surgery before the experiments (day 0). After the first set of behavioral tests, animals were maintained at 12:12 h light-dark cycles (LD) schedule for 10 days (10 cycles, lights on at 20h), followed by a 10:10 LD schedule for 6 or 11 days. Control groups were kept under 12:12 LD cycles throughout the experiment (17 or 22 days). Starting at cycle 11 (first 10:10 LD) mice were treated daily (i.p., at 14 h) with saline (NaCl 0.9%), imipramine 20 mg/kg, NAC 30 mg/kg or NAC 60 mg/kg. Injection volume was kept at 0.1 ml/10 g body weight.

#### **2.4 Rhythm characterization:**

*Rest/Activity:* Activity was recorded at home cages every 10 min all through the experiment (Actigraph, ADNpln- ©Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Spain), except for the brief period when mice received the daily drug administrations.

*Temperature:* ThermoChron iButtons (3.3 g, 17.5 mm diameter, Dallas Semiconductor, Dallas, TX) implanted into mouse abdominal cavity were used to record and store time and temperature data. Mice were anesthetized with i.p. ketamine/xylazine (100/10 mg/kg, i.p. Cetamin®/Xilazin® Syntec SP Brazil). After shaving the abdomen fur and cleaning the region with 70% alcohol, a longitudinal incision (~2 cm) was made along the midline; a disinfected iButton was inserted into the abdominal cavity, sutures were made with 4-0 nylon threads, animals kept warm until recovered from anesthesia, and returned to the individual home cages. Tramadol (1 mg/kg, s.c. Tramal® Hipolabor, MG, Brazil) was administered



immediately and 24 hours after surgery. iButtons were programmed to record data every 30 min and removed at the end of the experiment (17 or 22 days) after euthanasia (decapitation).

**2.5 Behavior:** Mice were submitted to the hole-board (HB) and social preference (SP) tests at the beginning of the experiment (test, day 0) and at cycle 18 (retest). The retest timing was chosen to coincide with acute changes observed in activity/temperature amplitude after adoption of shortened LD cycles. Experiments were performed during the dark phase (3-9 h after lights off).

*Hole-board:* The method was adapted from Takeda et al. (1998). The hole-board apparatus (Ugo Basile, Italy) consists in a gray Perspex panel (40 x 40 cm, 2.2 cm thick) with 16 equidistant holes (3 cm diameter) in the floor. The board was positioned 15 cm above the table and divided (black water-resistant marker) into nine 10 x 10 cm squares to assess locomotion (number of squares crossed with all 4 paws). Mice were habituated to the dimly lit room for 2 h before testing. Each animal was individually placed in the center of the board and the latency to the first head-dip, number of rearings and crossings were noted for 5 min. The number of head-dips was automatically recorded by photocells located below the surface.

*Social Preference:* A simplified version of the social novelty preference protocol (Naert et al., 2011) was adopted. The setup consists of a 40 x 40 x 40 cm melamine arena (black floor and gray walls), containing two inverted wire cages (inverted cups, diameter, 12 cm; height, 15.5 cm) placed diagonally in opposite corners of the arena. One camera was located 90 cm above the setup to record mouse movements. During the 10 min session one stranger mouse (slightly younger than test mouse and grouped housed) was placed in one of the cages while the other was left empty; within less than two minutes the test animal was placed in the center of the arena and the recording was started. By using the software Noldus The Observer® XT5.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda) the time spent exploring/sniffing the full (defined as social interaction) or empty cages were manually scored. Animals returned

to their home cage immediately after the session. The setup was thoroughly cleaned with ethanol 70% and paper towel between animals and at the end testing days. The social preference index was calculated as the time spent in social interaction (SI) minus the time spent exploring the empty cage (EC) divided by the total time (T) spent exploring the cages ( $(SI-EC)/T$ ).

## **2.6 Corticosterone and Interleukin-6 assessment:**

*Plasma samples:* one hour after the last social preference test (8-9 hours after lights off), mice were euthanized by decapitation, the trunk blood collected in heparinized 2.0 mL polypropylene microtubes and centrifuged at 2,000 x g at room temperature. Plasma aliquots were stored in 2.0 mL polypropylene microtubes at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further use.

*Corticosterone:* Plasma corticosterone was extracted with ethyl acetate (3x), diluted to 1:100 and measured (duplicates) with a corticosterone enzyme immunoassay kit (Enzo Life Sciences Int'l Inc, Plymouth Meeting, PA, USA). A microplate reader at 405 nm was used, according to the manufacturer's instructions. Results are reported in  $\text{ng/mL} \pm \text{SEM}$ .

*Interleukin-6 (IL-6):* IL-6 was measured in duplicate by an enzyme immunoassay kit (Quantikine® Kits, R&D Systems, USA) according to the manufacturer's instructions. Results are reported in  $\text{pg/mL} \pm \text{SEM}$ .

**2.7 Statistics:** Double Plot Actograms were used to demonstrate the rhythm of LD temperature and rest/activity in 12:12 and 10:10 LD. Activity and temperature rhythm amplitude were assessed using the Cosinor test analyzed by the El Temps software (© Antoni Díez Noguera, Barcelona, CA, Spain). One-way ANOVA followed by SNK or *t* test were used to compare temperature and activity amplitudes as appropriate; three-way ANOVA was precluded for excess residual data. One-way ANOVA was used to compare social interaction and hole-board data; Paired *t* test was used to compare test and retest sessions of hole-board and social preference. Corticosterone and interleukin-6 data were compared by one-way

ANOVA. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ , with a two-tailed hypothesis. Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 for Windows and SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### 3. Results

Figure 2 shows double plot actogram from saline group representing activity and temperature rhythms in 12:12 and 10:10 LD.

Decreased activity and temperature amplitudes during 10:10 LD are apparent (Fig. 3 A and B) and confirmed by Paired  $t$  tests ( $t_{19}$ : 5.87;  $t_{16}$ : 7.98,  $p < 0.001$ , respectively). Changes in activity and temperature follow a similar pattern: the initial decline is followed by peaks roughly 5 cycles apart. Regarding the effect of treatments, one-way ANOVA/SNK shows that the imipramine induced significant lower activity amplitude in comparison to other groups at cycles 16 ( $F_{3,75}$ : 7.21,  $p < 0.05$ ), 17 ( $F_{3,75}$ : 4.78,  $p < 0.05$ ), 22 ( $F_{3,35}$ : 6.46,  $p < 0.05$ ) and 23 ( $F_{3,35}$ : 9.39,  $p < 0.01$ ). Imipramine also induced decreased temperature amplitude in comparison to all other treatment groups at cycles 11 ( $F_{3,67}$ : 6.76,  $p < 0.05$ ), 18 ( $F_{3,28}$ : 5.81,  $p < 0.05$ ) and 23 ( $F_{3,28}$ : 8.14,  $p < 0.05$ ).

Hole-board (HB) data is shown at Figure 4. No significant effects of photoperiod (12:12 x 10:10 saline,  $t_{22}$ : -0,191.  $p > 0.05$ , Paired  $t$  test) were noted, whereas none of the treatments significantly altered HB test or retest ( $F_{3,37}$ : 0.028 and  $F_{3,37}$ : 0.278 for head-dips in test and retest respectively;  $F_{3,37}$ : 0.236 and  $F_{3,37}$ : 0.966 for latency for the first head-dip in test and retest respectively.  $p > 0.05$ , one-way ANOVA). Comparing HB retest and test, Paired  $t$  test indicates that control mice (12:12 LD) show significantly higher number of head-dips ( $p < 0.05$ ) and shorter latency for the first head-dip ( $p < 0.05$ ). The test/retest differences observed with controls were suppressed by the 10:10 LD schedule, except for the group treated with NAC 30 mg/kg in which increased number of head-dips is observed. No differences were

seen in the number of crossings and rearings across photoperiods, cycles or treatments groups (data not shown).

No significant differences among groups ( $p > 0.05$ ) were seen in the social preference test (data not shown).

Figure 5 shows corticosterone (A) and interleukin-6 (B) plasma levels. No significant effects of photoperiod or treatments were observed for corticosterone or interleukin-6 ( $F_{4,41}$ : 1.46,  $p > 0.05$ ;  $F_{4,33}$ : 0.91,  $p > 0.05$  respectively).

#### **4. Discussion**

This study shows that changes in photoperiod results in rhythm disruption accompanied by significant changes in activity, core temperature and behavior in BALB/c mice. In comparison with days under normal 12:12 LD cycles, the activity amplitude is decreased throughout the period under shorter cycles, remaining slightly lower for most of the 10 days (13 cycles) of the experiment. A steady decrease is seen after 4 cycles, followed by a wave-like pattern; at the end of the experiment activity amplitude is close to normal (12:12 LD) except for the group treated with imipramine. Decreases in temperature amplitude are noticeable after 4 shortened cycles, with rounds of recovery attempts with peaks at the 18<sup>th</sup> and 23<sup>rd</sup> cycles. Temperature amplitude is comparable to 12:12 LD by the end of the 10 days under shortened cycles, with the exception of mice treated with imipramine. The modified pattern of amplitude is remarkably similar in activity and temperature, though as expected temperature changes are seen after changes in activity. Karatsoreos et al (2011) reported that a 10:10 LD cycle schedule does not allow stable temperature circadian entrainment in C57BL/6 mice over 16 weeks. We here show that in BALB/c mice significant changes can be seen as early as after three 10:10 LD cycles, with unstable rhythms entrainment in both activity and temperature observed for at least 11 days.

The key findings of this study are the imipramine-induced decrease in rhythm robustness, and the protective effect of NAC on rhythm disruption-induced anxiety. Ethical reasons of randomized clinical trial designs determine that important gaps in the understanding of the effects of depression and/or antidepressant treatments in circadian rhythms persist (Refinetti & Menaker, 1993). Nevertheless, effects of antidepressants on circadian rhythms have been reported. Regarding imipramine, for decades the most widely used antidepressant (Menaker, 1993), effects are controversial. While Refinetti and Menaker (1993) did not observe significant effects of imipramine on activity and temperature phase in hamsters, Wirz-Justice and Campbell (1982) suggested that imipramine could slow or dissociate circadian activity rhythms in the same species. The detailed data analysis used in the present study allowed the identification of significant intermittent effects of imipramine in both activity and temperature amplitudes in mice. Because changes in amplitude are established measures of rhythm robustness, data suggests that imipramine may induce constantly disturbed rhythms. The possibility of a drug-induced maintenance of disturbed rhythms is clinically relevant since a positive association between sleep and circadian disturbances and rates of episode recurrences has been reported for depressed patients (Ford & Kamerow, 1989).

Decreased anxiety, restlessness and anxiety-related insomnia were reported as results from NAC adjunctive therapy in a case of generalized anxiety disorder (Strawn & Saldaña, 2012). NAC was shown to be beneficial to OCD (Lafleur et al., 2006) and trichotillomania (Odlaug & Grant, 2007; Grant et al., 2009) patients, as well as to inhibit marble-burying behavior in mice (Egashira et al., 2012). Although OCD is no longer classified as anxiety disorder, it is well known that compulsive behaviors are aggravated by anxiety. The hole-board test is suitable for identifying changes in anxiety levels, as well as anxiolytic and anxiogenic properties of drugs (Takeda et al., 1998); it has the advantage of measuring locomotion (number of crossings) to rule out false positives. The increased number of head-dips and

decreased latency for the first head-dip observed when control mice were retested indicate decreased anxiety, as expected with repeated exposure to the apparatus. The decreased anxiety at retest sessions was suppressed by the rhythm disruption induced with shortened cycles, except in the group treated with NAC 30 mg/kg. In contrast with imipramine, NAC did not induce changes in activity or temperature amplitudes.

Implicated in modulating the nucleus responses to external stimuli, multiple metabotropic glutamate receptors are co-expressed in SCN axon terminals (Chen & van den Pol, 1998). Both glutamate and rhythm changes have been shown to be relevant for depression and anxiety, and the relevance of glutamate modulation by NAC is highlighted by the key role of AMPA receptors in the antidepressive-like effects of NAC (Linck et al., 2012). Because our pilot experiments showed that forced swimming or tail suspension tests were precluded by the use of iButton (weighting circa 10% of mice body weight), a limitation of this study is the lack of established depression-like behavioral model. Reduced social interaction induced by chronic social defeat has been accepted as a depression model in mice (Wu et al., 2013), while repeated restraint stress-induced decreased social preference and social investigation has been used as a model of generalized anxiety (Morales et al., 2013). Though the presence of iButtons present no barrier to the social preference test, changes in photoperiod and/or treatments used in this study did not induce significant differences in social preference. Nevertheless, the data may have been influenced by the lack of adaptation to the social preference apparatus, given that social suppression may be harder to detect in unfamiliar anxiogenic circumstances where social behavior is already attenuated (Doremus-Fitzwater et al., 2009).

The diminished activation of glutamate post synaptic receptors, antioxidant and anti-inflammatory properties are thought to be relevant to the psychopharmacological effects of NAC (Dean et al., 2011). Changes in corticosterone and IL-6 levels have been correlated with

anxiety, depression and bipolar disorders (Cavanagh & Mathias, 2008; Piato et al., 2008; Detanico et al., 2009; Stertz et al., 2013; Vogelzangs et al., 2013). Moreover, IL-6 is highly sensitive to changes in light-dark cycles (Levandovski et al., 2013). Changes in photoperiod or drug treatments did not induce significant differences in corticosterone or IL-6 levels. Nevertheless, potential changes correlated with anxiety behavior cannot be ruled out without assessing marker levels in different time points (test and retest). Additional experiments allowing parallel measures of activity, temperature, corticosterone and IL-6 rhythms are therefore warranted.

A significant contribution of this study is the analysis timing after photoperiod change, which allowed the identification of mild but significant behavioral change. It is arguable that such changes in behavior repeated over long enough periods of time, as expected in subjects submitted to shift work or social jet lag, could trigger permanent behavior disturbances relevant to anxiety and mood disorders.

### **Acknowledgments**

The authors are thankful to Eliane Dallegrave, Marta Cioato, Fabíola S. Meyer, Roberta Andrejew, Adriana Coitinho and Ricardo Schneider for technical support and to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (LKP, YT, CLQ, RB, GM, MPH and EE) and CAPES (RL) for fellowships. This study was supported by FIPE/HCPA/UFRGS.

### **Declaration of Interest**

The authors report no conflict of interest.

## References

- Aguzzi J, Bullock NM, Tosini G. (2006). Spontaneous internal desynchronization of locomotor activity and body temperature rhythms from plasma melatonin rhythm in rats exposed to constant dim light. *J Circadian Rhythms*. 4:6.
- Berk M, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Bush AI. (2008). N-Acetyl Cysteine for Depressive Symptoms in Bipolar Disorder—A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Biol Psychiatry*. 64(6):468–75.
- Calandra C, Luca M, Luca A. (2013). Sleep disorders and depression: brief review of the literature, case report, and nonpharmacologic interventions for depression. *Clin Interv Aging*. 1033.
- Cambras T, Weller JR, Anglès-Pujoràs M, Lee ML, Christopher A, Díez-Noguera A, Krueger JM, de la Iglesia, HO. (2007). et al. Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*;104(18):7634–9.
- Carvalho LA, Gorenstein C, Moreno R, Pariante C, Markus RP. (2009). Effect of antidepressants on melatonin metabolite in depressed patients. *J Psychopharmacol Oxf Engl*. 23(3):315–21.
- Casiraghi LP, Oda GA, Chiesa JJ, Friesen WO, Golombek DA. (2012). Forced Desynchronization of Activity Rhythms in a Model of Chronic Jet Lag in Mice. *J Biol Rhythms*. 1;27(1):59–69.
- Cavanagh J, Mathias C. (2008). Inflammation and its relevance to psychiatry. *Adv Psychiatr Treat*. 14(4):248–55.
- Chen G, van den Pol AN. (1998). Coexpression of multiple metabotropic glutamate receptors in axon terminals of single suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol*. 80(4):1932–8.
- Costa-Campos L, Herrmann AP, Pilz LK, Michels M, Noetzold G, Elisabetsky E. (2013). Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 44:125–30.
- Dai H, Zhang L, Cao M, Song F, Zheng H, Zhu X, Wei Q, Zhang W, and Chen K. (2011). The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 127(2):531–40.



- Dean O, Giorlando F, Berk M. (2011). N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci JPN.* 36(2):78–86.
- Detanico BC, Piato AL, Freitas JJ, Lhullier FL, Hidalgo MP, Caumo W, Elisabetsky, E. (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur J Pharmacol.* 607(1-3):121–5.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. (2009). Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol. Behav.* 97(3-4):484–494.
- Egashira N, Shirakawa A, Abe M, Niki T, Mishima K, Iwasaki K, Oishi R, Fujiwara M. (2012). N-acetyl-L-cysteine inhibits marble-burying behavior in mice. *J Pharmacol Sci.* 119(1):97–101.
- Ergün Y, Ergün UGO, Orhan FO, Küçük E. (2006). Co-administration of a nitric oxide synthase inhibitor and melatonin exerts an additive antidepressant-like effect in the mouse forced swim test. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 12(9):BR307–312.
- Ferreira FR, Biojone C, Joca SRL, Guimarães FS. (2008). Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. *Behav Pharmacol.* 19(7):747–50.
- Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu M-W, Claustrat B, Gréchez-Cassiau A, , Guettier C, Hastings MH, Francis L. (2004). Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice. *Cancer Res.* 64(21):7879–85.
- Ford DE, Kamerow DB. (1989). Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention? *JAMA J Am Med Assoc.* 262(11):1479–84.
- Grant JE, Odlaug BL, Kim SW. (2009). N-acetylcysteine, a glutamate modulator, in the treatment of trichotillomania: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry.* 66(7):756–63.
- Grundschober C, Delaunay F, Pühlhofer A, Triqueneaux G, Laudet V, Bartfai T, Nef P. (2001). Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem.* 276(50):46751–8.

Hidalgo MPL, Caumo W, Dantas G, Franco DG, Torres IL da S, Pezzi J, Elisabetsky E, Detanico BC, Piato Â, Markus, RP. (2011). 6-Sulfatoxymelatonin as a predictor of clinical outcome in depressive patients. *Hum Psychopharmacol*. 26(3):252–7.

Karatsoreos IN, Bhagat S, Bloss EB, Morrison JH, McEwen BS. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(4):1657–1662.

Karatsoreos IN. (2012). Effects of circadian disruption on mental and physical health. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 12(2):218–25.

Lafleur DL, Pittenger C, Kelmendi B, Gardner T, Wasyluk S, Malison RT, Sanacora G, Krystal JH, Coric V. (2006). N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 184(2):254–6.

Lall GS, Atkinson LA, Corlett SA, Broadbridge PJ, Bonsall DR. (2012). Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 119(10):1085–96.

Lavebratt C, Sjöholm LK, Soronen P, Paunio T, Vawter MP, Bunney WE, Adolfsson R, Forsell Y, Wu JC, Kelsoe, JR et al. (2010). CRY2 Is Associated with Depression. *PLoS ONE*. 5(2):e9407.

Levandovski R, Pfaffenseller B, Carissimi A, Gama CS, Hidalgo MPL. (2013). The effect of sunlight exposure on interleukin-6 levels in depressive and non-depressive subjects. *BMC Psychiatry*. 13(1):1–8.

Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CRL, Elisabetsky E. (2012). AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol*. 23(2):171–7.

Martin J, Jeste DV, Caligiuri MP, Patterson T, Heaton R, Ancoli-Israel S. (2001). Actigraphic estimates of circadian rhythms and sleep/wake in older schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 47(1):77–86.

McClung CA. Circadian Genes, Rhythms and the Biology of Mood Disorders. (2007). *Pharmacol Ther*. 114(2):222–32.

- Moore RY. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med.* 48:253–66.
- Morales M, Varlinskaya EI, Spear LP. (2013). Anxiolytic effects of the GABA(A) receptor partial agonist, L-838,417: impact of age, test context familiarity, and stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 109:31–37.
- Naert A, Callaerts-Vegh Z, D’Hooge R. (2011). Nocturnal hyperactivity, increased social novelty preference and delayed extinction of fear responses in post-weaning socially isolated mice. *Brain Res Bull.* 85(6):354–62.
- Odlaug BL, Grant JE. (2007). N-acetyl cysteine in the treatment of grooming disorders. *J Clin Psychopharmacol.* 27(2):227–9.
- Papp M, Gruca P, Boyer P-A, Mocaër E. (2003). Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 28(4):694–703.
- Partonen T. Clock gene variants in mood and anxiety disorders. (2012). *J Neural Transm Vienna Austria 1996.* 119(10):1133–45.
- Piato AL, Detanico BC, Jesus JF, Lhullier FLR, Nunes DS, Elisabetsky E. (2008). Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *J Ethnopharmacol.* 118(2):300–4.
- Refinetti R, Menaker M. (1993). Effects of imipramine on circadian rhythms in the golden hamster. *Pharmacol Biochem Behav.* 45(1):27–33.
- Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 418(6901):935–41.
- Sanacora, G, Zarate, CA, Krystal, J, Manji, HK. (2008). Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7(5):426–437.
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 43(4):527–37.

Smaga I, Pomierny B, Krzyżanowska W, Pomierny-Chamioło L, Miszkiel J, Niedzielska E, Ogórka A, Filip M. (2012). N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 39(2):280–7.

Sookoian S, Gianotti TF, Burgueño A, Pirola CJ. (2010). Gene-gene interaction between serotonin transporter (SLC6A4) and CLOCK modulates the risk of metabolic syndrome in rotating shiftworkers. *Chronobiol Int*. 27(6):1202–18.

Srinivasan V, Lauterbach EC, Shillcutt SD, Berardis DD, Kuppuswamy PS, Zakaria R, Zakaria R, Othman Z, Acuña-Castroviejo D, and Partonen T. (2004). Melatonin in Mood Disorders and Agomelatine's Antidepressant Efficacy. In: Srinivasan V, Brzezinski A, Oter S, Shillcutt SD, eds. *Melatonin and Melatonergic Drugs in Clinical Practice*. Springer India. p. 281–95.

Stertz L, Magalhães PVS, Kapczinski F. (2013). Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 26(1):19–26.

Strawn JR, Saldaña SN. (2012). Treatment with Adjunctive N -Acetylcysteine in an Adolescent with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor-Resistant Anxiety. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 22(6):472–3.

Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T. (1998). Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol*. 350(1):21–9.

Vogelzangs N, Beekman ATF, de Jonge P, Penninx BWJH. (2013). Anxiety disorders and inflammation in a large adult cohort. *Transl Psychiatry*. 3:e249.

Wirz-Justice A, Campbell IC. (1982). Antidepressant drugs can slow or dissociate circadian rhythms. *Experientia*. 38(11):1301–9.

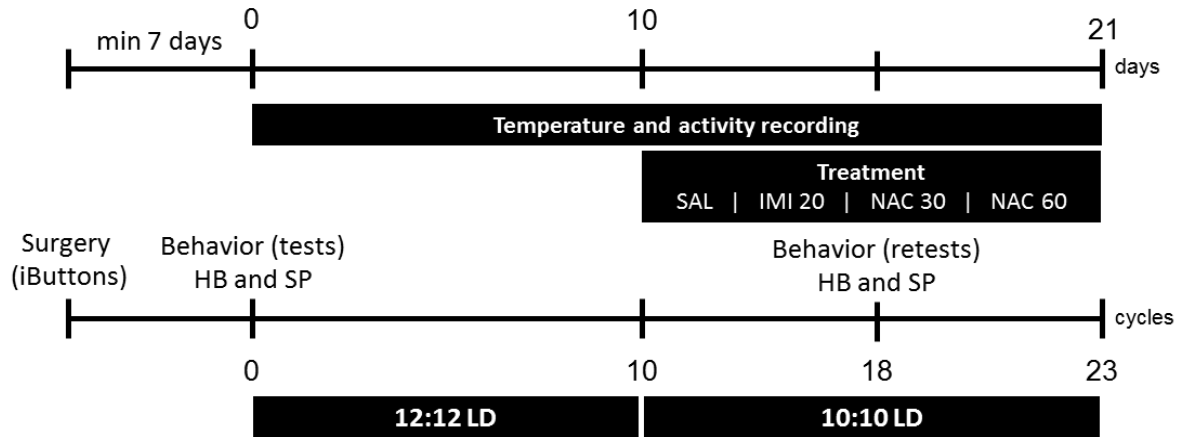
Wirz-Justice A, Cajochen C, Nussbaum P. (1997). A schizophrenic patient with an arrhythmic circadian rest-activity cycle. *Psychiatry Res*. 73(1-2):83–90.

World Health Organization. (2008). *The global burden of disease: 2004 update*. Geneva, Switzerland. WHO Press.

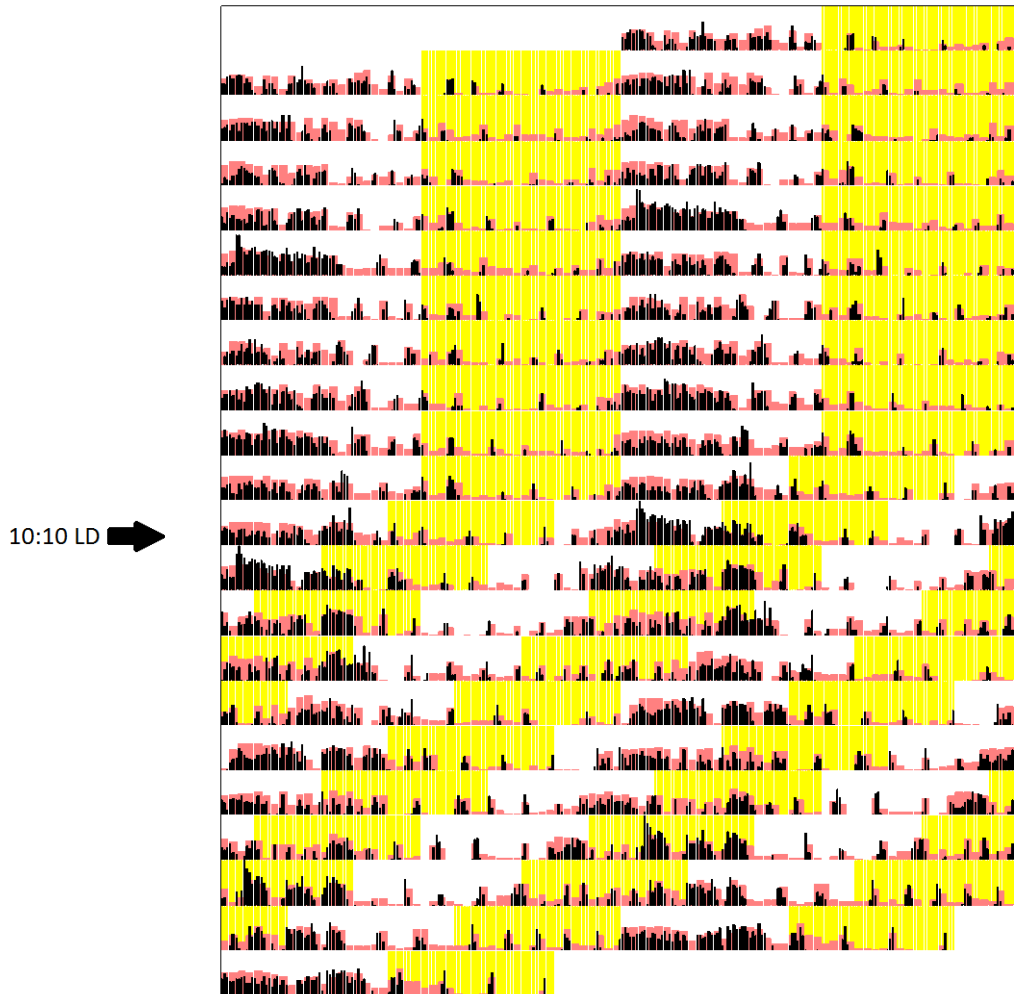
Wu X, Wu J, Xia S, Li B, Dong J. (2013). Icaritin opposes the development of social aversion after defeat stress via increases of GR mRNA and BDNF mRNA in mice. *Behav. Brain Res.* 256:602–608.

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature.* 400(6740):169–73.

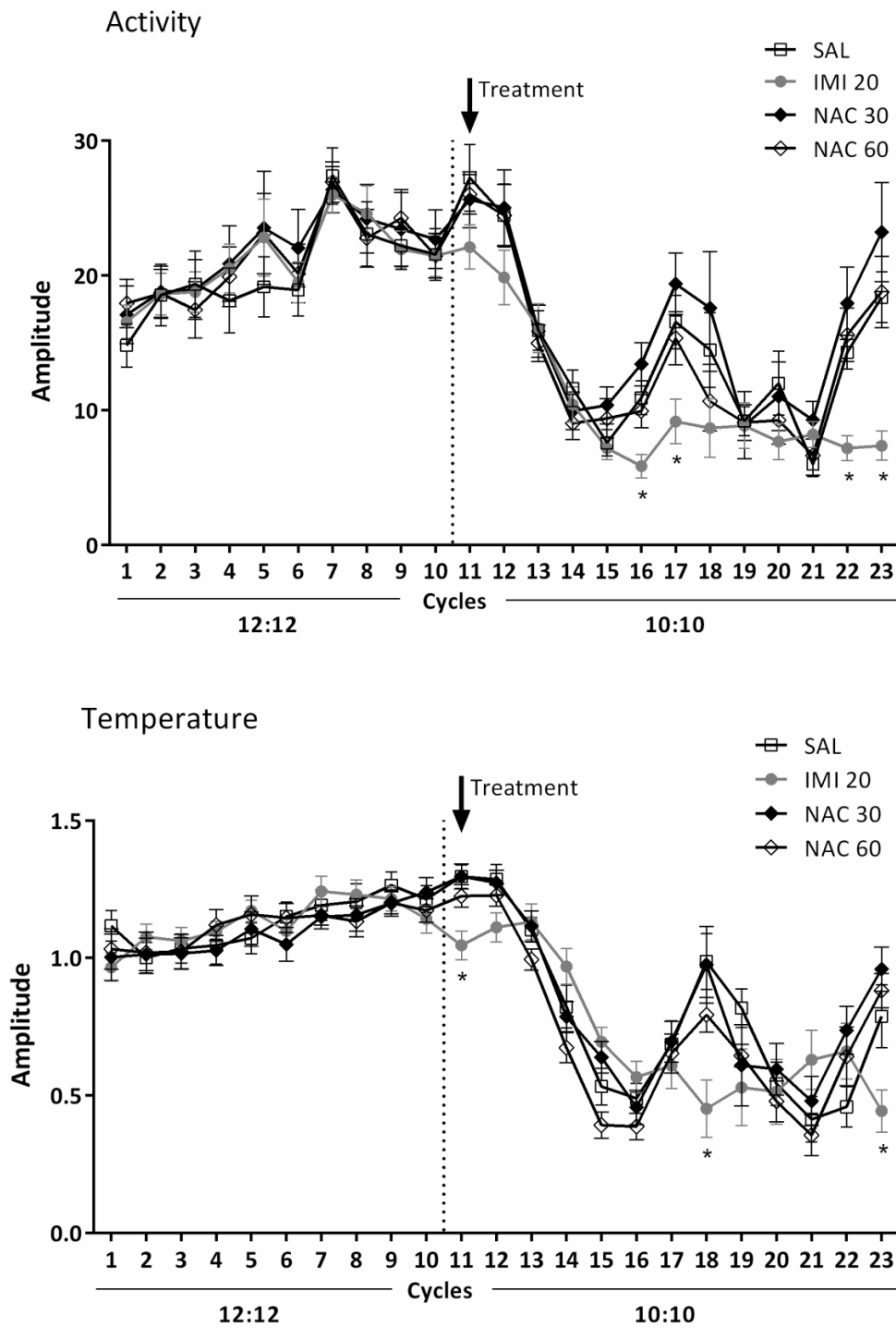
## Legends



**Fig. 1: Experimental design.** 12:12 LD = 12:12 h light-dark cycles (lights on at 20h); 10:10 LD = 10:10 h light-dark cycles. SAL= saline; IMI = Imipramine; NAC = N-acetylcysteine; number corresponds to dose in mg/kg. HB = hole-board test. SP = social preference test.

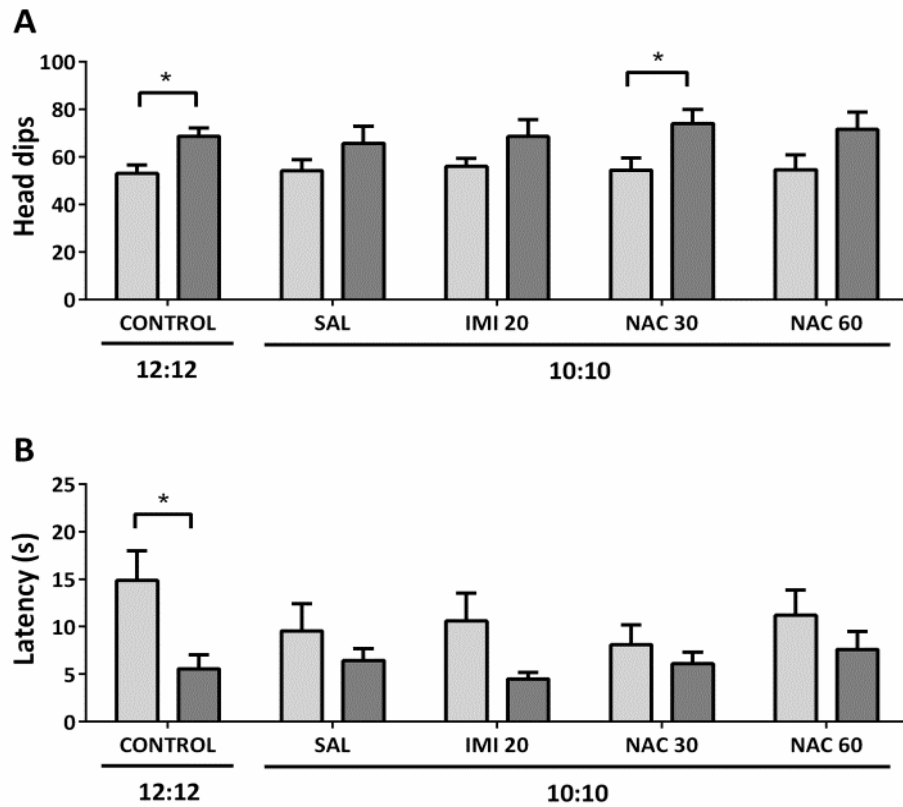


**Fig. 2: Circadian disruption induced by 10:10 LD cycles.** Double plot actogram illustrates exemplary daily changes in rest/activity (black) and core body temperature (red) in BALB/c mice during 12:12 and 10:10 LD cycles. Periods with lights on are shown in yellow. The pattern shows unsuccessful repeated attempts to synchronize to the shortened cycle.

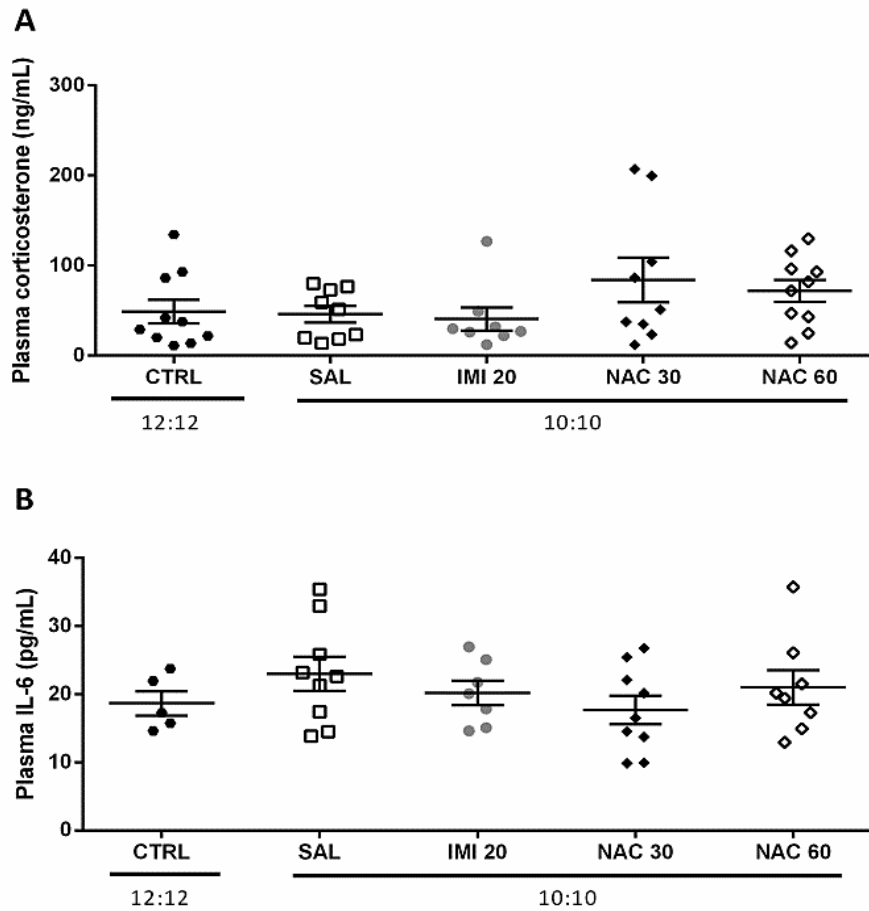


**Fig. 3: Activity and temperature amplitude during 12:12 and 10:10 LD cycles.** Activity and temperature amplitude data derived from cosinor test.  $n = 17-20$  for cycle 1 to 17.  $n = 7-10$  for cycle 18 to 23. Data expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in comparison with all other groups, ANOVA/SNK.





**Fig. 4: Effects of photoperiod and antidepressants in the hole-board test.** Number of head-dips (A) and latency for the first head-dip (B). Lighter columns show test and darker columns show retest, mean  $\pm$  SEM. SAL= saline; IMI 20 = Imipramine 20 mg/kg; NAC 30 and 60 = N-acetylcysteine 30 and 60 mg/kg, respectively.  $n = 10-14$ . \*  $p < 0.05$ , test x retest, Paired  $t$  test.  $p > 0.05$  for photoperiod effect on test or retest sessions (12:12 x 10:10 saline),  $p > 0.05$ , for treatments effects on test or retest session.



**Fig. 5: Plasma corticosterone (A) and interleukin-6 (B) levels.** SAL= saline; IMI 20 = Imipramine 20 mg/kg; NAC 30 and 60 = N-acetylcysteine 30 and 60 mg/kg, respectively.  $n = 5-10$ . Data expressed as mean  $\pm$  SEM.  $p > 0.05$ , ANOVA.

## 5. DISCUSSÃO

A maneira como a humanidade percebe e se relaciona com o tempo se transforma ao longo da história (os fusos-horários, por exemplo, só foram adotados em 1884), assim como se diferencia geográfica e culturalmente (não é por acaso que falamos em ‘pontualidade britânica’). De maneira geral, o que se constata atualmente é que boa parte das pessoas ainda vive *pressionada pelo relógio* ou, como se diz, *correndo atrás do tempo*. O tempo métrico ainda controla o que o trabalhador deve estar fazendo a cada hora, assim como o seu pagamento é definido por horas de trabalho. No *modus vivendi* atual da maior parte das sociedades (com exceção do continente africano), grande quantidade de atividades, prazos curtos, fluxo informacional e ritmos sociais cada vez mais dinâmicos e intensos são características de uma sociedade *que não pára*.

Nesse contexto, destaca-se a importância do estudo de outro relógio – não o mecânico, mas o biológico - cuja existência vem sendo negligenciada. Para seres vivos expostos a um ambiente com alterações cíclicas constantes, como dia/noite e estações do ano, torna-se vantajosa a capacidade de prever mudanças ambientais e assim explorar a situação da melhor maneira possível. É essa vantagem adaptativa que determinou a permanência dos relógios biológicos ao longo da evolução; praticamente todas as plantas e animais apresentam ritmos endógenos e as transições dia/noite são utilizadas como referência para determinação de rotinas diárias pela maioria das espécies. O ser humano é o primeiro a fugir deste padrão: possibilidades trazidas pela luz elétrica, serviços 24 h e atividades sociais e comerciais noturnas determinam a rejeição do instinto natural do homem de dormir à noite. Negligenciar esta preferência de fase dos nossos processos fisiológicos e comportamentais não vem sem custo, uma vez que na tentativa constante de adaptação e sincronização com o ambiente, nossos relógios internos perdem a sincronia entre si possibilitando a ocorrência da ruptura de ritmos. Numa orquestra, se os músicos não conseguem se adaptar às rápidas e constantes

indicações de alteração de tempo do maestro, a música não é bem executada. Da mesma forma, em nosso organismo, se os osciladores periféricos precisam se adaptar constantemente a alterações temporais sinalizadas pelo marcapasso (o núcleo supraquiasmático, no caso dos mamíferos), a saúde é prejudicada.

Mesmo reconhecendo e considerando a complexidade do comportamento humano, para a Cronobiologia, modelos animais que mimetizem os efeitos das condições a que submetemos nosso organismo são importantes na compreensão de como as alterações dos ritmos biológicos interferem em nossa saúde. Neste contexto, este trabalho buscou avaliar os efeitos agudos da ruptura de ritmos circadianos, relevante para o entendimento de sua contribuição na etiologia de problemas de saúde em indivíduos suscetíveis. No trabalho aqui apresentado foram observadas alterações que podem ser consideradas sutis, mas que possivelmente contribuem de maneira significativa para que indivíduos submetidos a estes efeitos de maneira constante e intermitente (como plantonistas, por exemplo) desenvolvam alterações permanentes e prejuízos acentuados para saúde.

A teoria proposta por Ehlers et al (1988) de que o *zeitgeber* social contribui para o desencadeamento da depressão, sugere que eventos estressantes da vida provocam ruptura dos ciclos circadianos, desencarrilhando o relógio interno e levando a episódios depressivos em indivíduos suscetíveis (Ehlers et al. 1988; McClung 2011). A maioria dos medicamentos antidepressivos utilizados na clínica apresenta eficácia terapêutica de valor discutível e seus mecanismos de ação são baseados na hipótese monoaminérgica. Cerca de 20 antidepressivos foram introduzidos no mercado desde a imipramina na década de 50 e, ainda assim, apenas 50-60% dos pacientes responde ao primeiro tratamento com antidepressivo (Sanacora *et al.*, 2012) sendo altos os riscos de recidiva (Richards, 2011). Considerando a possibilidade de que a ruptura de ritmos esteja relacionada a transtornos psiquiátricos como a depressão, tratamentos que restaurassem a sincronicidade dos ritmos internos poderiam não apenas

aliviar os sintomas, como contribuir para menor ocorrência de recidivas. Por outro lado, pode-se argumentar que tratamentos que, apesar de amenizarem sintomas, provoquem alterações negativas nos ritmos poderiam melhorar o estado do paciente em determinados aspectos, porém dificultar a recuperação a longo prazo. Os dados aqui apresentados indicam que a imipramina, antidepressivo tricíclico há muito entre os mais utilizados no tratamento da depressão, induz diminuição da robustez de ritmos. Uma vez que associação positiva entre alterações de sono e de ritmos e taxas de recorrência de episódios depressivos já foi relatada, a possibilidade de que ritmos possam estar sendo constantemente alterados negativamente por drogas antidepressivas tem implicações clínicas e de saúde pública bastante relevantes.

O outro achado relevante do nosso estudo indica que a N-acetilcisteína (NAC) não modifica a robustez dos ritmos e que ainda parece prevenir a condição de ansiedade aumentada induzida pela alteração de fotoperíodo. A modulação de glutamato pela NAC parece ser o mecanismo de ação mais relevante para os ritmos biológicos, uma vez que o glutamato está envolvido em importantes vias no núcleo supraquiasmático. Ainda é interessante mencionar que a modulação glutamatérgica por NAC é principalmente relevante quando há alteração do sistema, já que é nestas situações que há ativação dos receptores metabotrópicos extra sinápticos. Assim, seria exatamente nos momentos em que os ritmos estão alterados, como após uma alteração aguda e antes que o sistema se reorganize, que a NAC preveniria o início de uma cascata a jusante de alterações que podem determinar os efeitos do desencarrilhamento dos ritmos nos sistemas do organismo.

## 6. CONCLUSÃO

Em uma sociedade que exige que as necessidades fisiológicas do indivíduo sejam esquecidas em detrimento da conquista de um espaço no competitivo mercado de trabalho, os prejuízos à saúde são inerentes ou vistos como mal necessário. O estudo aqui apresentado avalia o efeito de tratamentos que, apesar de serem necessários no contexto contemporâneo, ilustram mais uma vez a importância de uma visão crítica à cultura condicionada por ritmos agenciados pela lógica materialista, que busca resultados a qualquer custo ignorando a importância dos ritmos biológicos. Nesse sentido, é importante alertar para certa contradição a que podemos chegar com a oposição entre o relógio ‘artificial’ e nosso relógio ‘vivo’ e as consequências que esta pode determinar.

O compromisso científico nos impulsiona a tentar contribuir trazendo dados mais conclusivos em relação ao envolvimento de alterações de ritmos na depressão, bem como em relação ao NAC como um tratamento que apresente vantagens nesse sentido por meio de novos experimentos com desenhos experimentais que permitam a avaliação concomitante de ritmos e comportamento tipo-depressivo (por exemplo, com modelos de estresse, testes de preferência de comida palatável ou interação social com protocolo melhor adaptado). Também seria fundamental avaliar o efeito de mudanças de ciclo intermitentes sustentadas por um período de tempo razoável num modelo que melhor mimetize a condição enfrentada por trabalhadores de turno variável.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abrahamson, E.E., Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172–191.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., Kyriacou, C.P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol. CB* 12, 540–550.
- Aston, C., Jiang, L., Sokolov, B.P. (2004). Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* 77, 858–866.
- Avery, D.H., Dahl, K., Savage, M.V., Brengelmann, G.L., Larsen, L.H., Kenny, M.A., Eder, D.N., Vitiello, M.V., Prinz, P.N. (1997). Circadian temperature and cortisol rhythms during a constant routine are phase-delayed in hypersomnic winter depression. *Biol. Psychiatry* 41, 1109–1123.
- Bartness, T.J., Song, C.K., Demas, G.E. (2001). SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J. Biol. Rhythms* 16, 196–204.
- Bechtold, D.A., Gibbs, J.E., Loudon, A.S.I. (2010). Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 191–198.
- Berk, M., Copolov, D.L., Dean, O., Lu, K., Jeavons, S., Schapkaitz, I., Anderson-Hunt, M., Bush, A.I. (2008). N-Acetyl Cysteine for Depressive Symptoms in Bipolar Disorder – A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Biol. Psychiatry* 64, 468–475.
- Berk, M., Malhi, G.S., Gray, L.J., Dean, O.M. (2013). The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 167–177.
- Bittencourt, L.R.A., Santos-Silva, R., de Mello, M.T., Andersen, M.L., Tufik, S. (2010). Chronobiological disorders: current and prevalent conditions. *J. Occup. Rehabil.* 20, 21–32.
- Boivin, D. (2000). Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *J. Psychiatry Neurosci.* 25, 446–458.
- Buhr, E.D., Takahashi, J.S. (2013). Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–27.
- Buhr, E.D., Yoo, S.-H., Takahashi, J.S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330, 379–385.
- Bulut, M., Savas, H.A., Altindag, A., Virit, O., Dalkilic, A. (2009). Beneficial effects of N-acetylcysteine in treatment resistant schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 10, 626–628.

- De Bundel, D., Gangarossa, G., Biever, A., Bonnefont, X., Valjent, E. (2013). Cognitive dysfunction, elevated anxiety, and reduced cocaine response in circadian clock-deficient cryptochrome knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 152.
- Buxton, O.M., Cain, S.W., O'Connor, S.P., Porter, J.H., Duffy, J.F., Wang, W., Czeisler, C.A., Shea, S.A. (2012). Adverse metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Sci. Transl. Med.* 4, 129ra43.
- Cambras, T., Weller, J.R., Anglès-Pujoràs, M., Lee, M.L., Christopher, A., Díez-Noguera, A., Krueger, J.M., de la Iglesia, H.O. (2007). Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7634–7639.
- Cassone, V.M., Speh, J.C., Card, J.P., Moore, R.Y. (1988). Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms* 3, 71–91.
- Cermakian, N., Lamont, E.W., Boudreau, P., Boivin, D.B. (2011). Circadian clock gene expression in brain regions of Alzheimer's disease patients and control subjects. *J. Biol. Rhythms* 26, 160–170.
- Chen, G., van den Pol, A.N. (1998). Coexpression of multiple metabotropic glutamate receptors in axon terminals of single suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurophysiol.* 80, 1932–1938.
- Cho, K. (2001). Chronic “jet lag” produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nat. Neurosci.* 4, 567–568.
- Cho, K., Ennaceur, A., Cole, J.C., Suh, C.K. (2000). Chronic jet lag produces cognitive deficits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, RC66.
- Colwell, C.S., Menaker, M. (1992). NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. *J. Biol. Rhythms* 7, 125–136.
- Dean, O., Giorlando, F., Berk, M. (2011). N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 36, 78–86.
- Detanico, B.C., Piato, A.L., Freitas, J.J., Lhullier, F.L., Hidalgo, M.P., Caumo, W., Elisabetsky, E. (2009). Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 121–125.
- Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., Faiman, L.E., Rea, M.A., Gillette, M.U. (1994). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science* 266, 1713–1717.
- Ebling, F.J. (1996). The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Neurobiol.* 50, 109–132.



- Ehlers, C.L., Frank, E., Kupfer, D.J. (1988). Social zeitgebers and biological rhythms. A unified approach to understanding the etiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 948–952.
- Eisenstein, M. (2013). Chronobiology: stepping out of time. *Nature* 497, S10–12.
- Ergün, Y., Ergün, U.G.O., Orhan, F.O., Küçük, E. (2006). Co-administration of a nitric oxide synthase inhibitor and melatonin exerts an additive antidepressant-like effect in the mouse forced swim test. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 12, BR307–312.
- Frank, E., Sidor, M.M., Gamble, K.L., Cirelli, C., Sharkey, K.M., Hoyle, N., Tikotzky, L., Talbot, L.S., McCarthy, M.J., Hasler, B.P. (2013). Circadian clocks, brain function, and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1306, 43–67.
- Gannon, R.L., Rea, M.A. (1994). In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23, 338–344.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564–1569.
- Golombek, D.A., Casiraghi, L.P., Agostino, P.V., Paladino, N., Duhart, J.M., Plano, S.A., Chiesa, J.J. (2013). The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *J. Physiol. Paris* 107, 310–322.
- Grant, J.E., Odlaug, B.L., Kim, S.W. (2009). N-acetylcysteine, a glutamate modulator, in the treatment of trichotillomania: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 756–763.
- Griffin, E.A., Jr, Staknis, D., Weitz, C.J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286, 768–771.
- Grundschober, C., Delaunay, F., Pühhöfer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T., Nef, P. (2001). Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 46751–46758.
- Gu, C., Liu, Z., Schwartz, W.J., Indic, P. (2012). Photic desynchronization of two subgroups of circadian oscillators in a network model of the suprachiasmatic nucleus with dispersed coupling strengths. *PloS One* 7, e36900.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., Cermakian, N. (2005). Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391–403.
- Haak, L.L. (1999). Metabotropic glutamate receptor modulation of glutamate responses in the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* 81, 1308–1317.

- Haak, L.L., Albers, H.E., Mintz, E.M. (2006). Modulation of photic response by the metabotropic glutamate receptor agonist t-ACPD. *Brain Res. Bull.* 71, 97–100.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B., Maywood, E.S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 649–661.
- Haus, E., Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control CCC* 17, 489–500.
- Hidalgo, M.P.L., Caumo, W., Dantas, G., Franco, D.G., Torres, I.L. da S., Pezzi, J., Elisabetsky, E., Detanico, B.C., Piato, Â., Markus, R.P. (2011). 6-Sulfatoxymelatonin as a predictor of clinical outcome in depressive patients. *Hum. Psychopharmacol.* 26, 252–257.
- Ibuka, N., Kawamura, H. (1975). Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res.* 96, 76–81.
- Jagannath, A., Peirson, S.N., Foster, R.G. (2013). Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness. *Curr. Opin. Neurobiol.*
- Jones, S.H., Hare, D.J., Evershed, K. (2005). Actigraphic assessment of circadian activity and sleep patterns in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 7, 176–186.
- Karatsoreos, I.N. (2012). Effects of circadian disruption on mental and physical health. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 12, 218–225.
- Karatsoreos, I.N., Bhagat, S., Bloss, E.B., Morrison, J.H., McEwen, B.S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1657–1662.
- Keefe, R.S.E., Bilder, R.M., Davis, S.M., Harvey, P.D., Palmer, B.W., Gold, J.M., Meltzer, H.Y., Green, M.F., Capuano, G., Stroup, T.S., McEvoy J.P., Swartz M.S., Rosenheck R.A., Perkins D.O., Davis C.E. Hsiao, J.K., Lieberman, J.A., CATIE Investigators; Neurocognitive Working Group. (2007). Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 633–647.
- Kelly, G. (2006). Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 11, 278–293.
- Knutsson, A., Bøggild, H. (2010). Gastrointestinal disorders among shift workers. *Scand. J. Work. Environ. Health* 36, 85–95.
- Koenigsberg, H.W., Teicher, M.H., Mitropoulou, V., Navalta, C., New, A.S., Trestman, R., Siever, L.J. (2004). 24-h Monitoring of plasma norepinephrine, MHPG, cortisol, growth hormone and prolactin in depression. *J. Psychiatr. Res.* 38, 503–511.
- Koller, M. (1983). Health risks related to shift work. An example of time-contingent effects of long-term stress. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 53, 59–75.

Kondratova, A.A., Kondratov, R.V. (2012). The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 325–335.

Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J. (2007). Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. *Cell* 131, 391–404.

Lafleur, D.L., Pittenger, C., Kelmendi, B., Gardner, T., Wasyluk, S., Malison, R.T., Sanacora, G., Krystal, J.H., Coric, V. (2006). N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 254–256.

Lall, G.S., Atkinson, L.A., Corlett, S.A., Broadbridge, P.J., Bonsall, D.R. (2012). Circadian entrainment and its role in depression: a mechanistic review. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 119, 1085–1096.

Lavebratt, C., Sjöholm, L.K., Soronen, P., Paunio, T., Vawter, M.P., Bunney, W.E., Adolfsson, R., Forsell, Y., Wu, J.C., Kelsoe, J.R., Partonen, T., Schalling, M. (2010). CRY2 Is Associated with Depression. *PLoS ONE* 5, e9407.

Lavoie, S., Murray, M.M., Deppen, P., Knyazeva, M.G., Berk, M., Boulat, O., Bovet, P., Bush, A.I., Conus, P., Copolov, D., Fornari, E., Meuli, R., Solida, A., Vianin, P., Cuénod, M., Buclin T., Do, K.Q. (2008). Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 2187–2199.

Levandovski, R., Dantas, G., Fernandes, L.C., Caumo, W., Torres, I., Roenneberg, T., Hidalgo, M.P.L., Allebrandt, K.V. (2011). Depression Scores Associate With Chronotype and Social Jetlag in a Rural Population. *Chronobiol. Int.* 28, 771–778.

Lewy, A.J., Emens, J.S., Songer, J.B., Sims, N., Laurie, A.L., Fiala, S.C., Buti, A.L. (2009). Winter Depression: Integrating mood, circadian rhythms, and the sleep/wake and light/dark cycles into a bio-psycho-social-environmental model. *Sleep Med. Clin.* 4, 285–299.

Liu, Z., Chu, G. (2012). Chronobiology in mammalian health. *Mol. Biol. Rep.*

Magalhães, P.V., Dean, O.M., Bush, A.I., Copolov, D.L., Malhi, G.S., Kohlmann, K., Jeavons, S., Schapkaitz, I., Anderson-Hunt, M., Berk, M. (2011). N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. *J. Affect. Disord.* 129, 317–320.

Mansour, H.A., Talkowski, M.E., Wood, J., Chowdari, K.V., McClain, L., Prasad, K., Montrose, D., Fagiolini, A., Friedman, E.S., Allen, M.H., Allen, M.H., Bowden, C.L., Calabrese J., El-Mallakh, R.S., Escamilla, M., Faraone, S.V., Fossey M.D., Gyulai, L., Loftis, J.M., Hauser, P., Ketter, T.A., Marangell, L.B., Miklowitz, D.J., Nierenberg, A.A., Patel, J.,

- Sachs, G.S., Sklar, P., Smoller, J.W., Laird, N., Keshavan, M., Thase M.E., Axelson, D., Birmaher, B., Lewis, D., Monk, T., Frank, E., Kupfer, D.J., Devlin, B., Nimgaonkar, V.L. (2009). Association study of 21 circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disord.* *11*, 701–710.
- Mantovani, M., Pértile, R., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S. (2003). Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* *343*, 1–4
- Markus, R.P., Ferreira, Z.S., Fernandes, P.A.C.M., Cecon, E. (2007). The Immune-Pineal Axis: A Shuttle between Endocrine and Paracrine Melatonin Sources. *Neuroimmunomodulation* *14*, 126–133.
- Martin, J., Jeste, D.V., Caliguiri, M.P., Patterson, T., Heaton, R., Ancoli-Israel, S. (2001). Actigraphic estimates of circadian rhythms and sleep/wake in older schizophrenia patients. *Schizophr. Res.* *47*, 77–86.
- McCarthy, M.J., Welsh, D.K. (2012). Cellular Circadian Clocks in Mood Disorders. *J. Biol. Rhythms* *27*, 339–352.
- McClung, C.A. (2007). Circadian Genes, Rhythms and the Biology of Mood Disorders. *Pharmacol. Ther.* *114*, 222–232.
- McClung, C.A. (2011). Circadian rhythms and mood regulation: insights from pre-clinical models. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *21 Suppl 4*, S683–693.
- McClung, C.A. (2013). How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways.. *Biol. Psychiatry* *74*, 242–249.
- Michel, S., Itri, J., Colwell, C.S. (2002). Excitatory mechanisms in the suprachiasmatic nucleus: the role of AMPA/KA glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* *88*, 817–828.
- Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., Mick, G., Vrang, N., Ebling, F.J., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Møller, M. (1995). Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: role of excitatory neurotransmission. *Neurochem. Int.* *27*, 263–272.
- Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M., Albers, H.E. (1999). Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 5124–5130.
- Mizoro, Y., Yamaguchi, Y., Kitazawa, R., Yamada, H., Matsuo, M., Fustin, J.-M., Doi, M., Okamura, H. (2010). Activation of AMPA receptors in the suprachiasmatic nucleus phase-shifts the mouse circadian clock in vivo and in vitro. *PloS One* *5*, e10951.

- Monteleone, P., Maj, M. (2008). The circadian basis of mood disorders: recent developments and treatment implications. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *18*, 701–711.
- Monti, J.M., BaHammam, A.S., Pandi-Perumal, S.R., Bromundt, V., Spence, D.W., Cardinali, D.P., Brown, G.M. (2013). Sleep and circadian rhythm dysregulation in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *43*, 209–216.
- Moore, R.Y., Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* *42*, 201–206.
- Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K., Nakamura, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A., Shigeyoshi, Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 6141–6151.
- Nakamura, W., Yamazaki, S., Takasu, N.N., Mishima, K., Block, G.D. (2005). Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5481–5487.
- Odlaug, B.L., Grant, J.E. (2007). N-acetyl cysteine in the treatment of grooming disorders. *J. Clin. Psychopharmacol.* *27*, 227–229.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307–320.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J.M., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* *273*, 2813–2838.
- Partonen, T. (2012). Clock gene variants in mood and anxiety disorders. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* *119*, 1133–1145.
- Pietrojusti, A., Forlini, A., Magrini, A., Galante, A., Coppeta, L., Gemma, G., Romeo, E., Bergamaschi, A. (2006). Shift work increases the frequency of duodenal ulcer in H pylori infected workers. *Occup. Environ. Med.* *63*, 773–775.
- Ralph, M.R., Lehman, M.N. (1991). Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci.* *14*, 362–366.
- Rao, M.L., Gross, G., Strebel, B., Halaris, A., Huber, G., Bräunig, P., Marler, M. (1994). Circadian rhythm of tryptophan, serotonin, melatonin, and pituitary hormones in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *35*, 151–163.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* *418*, 935–941.

- Richards, D. (2011). Prevalence and clinical course of depression: A review. *Clin. Psychol. Rev.* 31, 1117–1125.
- Roenneberg, T., Kuehnle, T., Juda, M., Kantermann, T., Allebrandt, K., Gordijn, M., Mellow, M. (2007). Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med. Rev.* 11, 429–438.
- Roenneberg, T., Allebrandt, K.V., Mellow, M., Vetter, C. (2012). Social jetlag and obesity. *Curr. Biol.* CB 22, 939–943.
- Roybal, K., Theobald, D., Graham, A., DiNieri, J.A., Russo, S.J., Krishnan, V., Chakravarty, S., Peevey, J., Oehrlein, N., Birnbaum, S., Vitaterna, M.H., Orsulak, P., Takahashi, J.S., Nestler E.J., Carlezon, W.A. Jr, McClung, C.A. (2007). Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6406–6411.
- Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J., Manji, H.K. (2008). Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 426–437.
- Sanacora, G., Treccani, G., Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63–77.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., Hogenesch, J.B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527–537.
- Schwartz, M.D., Wotus, C., Liu, T., Friesen, W.O., Borjigin, J., Oda, G.A., de la Iglesia, H.O. (2009). Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17540–17545.
- Schwartz, P.J., Rosenthal, N.E., Turner, E.H., Drake, C.L., Liberty, V., Wehr, T.A. (1997). Seasonal variation in core temperature regulation during sleep in patients with winter seasonal affective disorder. *Biol. Psychiatry* 42, 122–131.
- Soria, V., Martinez-Amoros, E., Escaramis, G., Valero, J., Perez-Egea, R., Garcia, C., Gutierrez-Zotes, A., Puigdemont, D., Bayes, M., Crespo, J.M., Martorell, L., Vilella, E., Labad, A., Vallejo, J., Pérez, V., Menchón, J.M., Estivill, X., Gratacòs, M., Urretavizcaya, M. (2010). Differential Association of Circadian Genes with Mood Disorders: CRY1 and NPAS2 are Associated with Unipolar Major Depression and CLOCK and VIP with Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1279–1289.
- De Souza, C.M., Hidalgo, M.P.L. (2013). Midpoint of sleep on school days is associated with depression among adolescents. *Chronobiol. Int.*
- Srinivasan, V., Singh, J., Pandi-Perumal, S.R., Brown, G.M., Spence, D.W., Cardinali, D.P. (2010). Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs. *Adv. Ther.* 27, 796–813.

- Stephan, F.K., Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 1583–1586.
- Strawn, J.R., Saldaña, S.N. (2012). Treatment with Adjunctive *N*-Acetylcysteine in an Adolescent with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor-Resistant Anxiety. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* *22*, 472–473.
- Tsujimoto, T., Yamada, N., Shimoda, K., Hanada, K., Takahashi, S. (1990). Circadian rhythms in depression. Part II: Circadian rhythms in inpatients with various mental disorders. *J. Affect. Disord.* *18*, 199–210.
- Wirz-Justice, A., Cajochen, C., Nussbaum, P. (1997). A schizophrenic patient with an arrhythmic circadian rest-activity cycle. *Psychiatry Res.* *73*, 83–90.
- World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, Switzerland. WHO Press. 2008
- Wright, K.P. Jr, Hull, J.T., Hughes, R.J., Ronda, J.M., Czeisler, C.A. (2006). Sleep and wakefulness out of phase with internal biological time impairs learning in humans. *J. Cogn. Neurosci.* *18*, 508–521.
- Wulff, K., Gatti, S., Wettstein, J.G., Foster, R.G. (2010). Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 589–599.
- Wulff, K., Dijk, D.J., Middleton, B., Foster, R.G., Joyce, E.M. (2012). Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* *200*, 308–316.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* *288*, 682–685.
- Yang, S., Van Dongen, H.P.A., Wang, K., Berrettini, W., Bućan, M. (2009). Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* *14*, 143–155.
- Zhen Lu, W., Ann Gwee, K., Yu Ho, K. (2006). Functional bowel disorders in rotating shift nurses may be related to sleep disturbances. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *18*, 623–627.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., Bradley, A. (1999). The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* *400*, 169–173.