

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PAULA TERESINHA TONIN**

**EFEITOS DO TRATAMENTO ADJUNTO DE LÍTIO COM  
CELECOXIB SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO  
MANÍACO, NÍVEIS DE CITOCINAS E PARÂMETROS DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO ANIMAL DE  
MANIA DOPAMINÉRGICO**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. João Luciano  
de Quevedo

Co-orientadores: Profa. Dra. Samira  
S. Valvassori

Prof. Dr. Jair C. Soares

**CRICIÚMA, 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T665e Tonin, Paula Teresinha.

Efeitos do tratamento adjunto de lítio com celecoxib sobre comportamento do tipo maníaco, níveis de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de mania dopaminérgico / Paula Teresinha. – 2017.

80 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Orientação: João Luciano de Quevedo.

Coorientação: Samira S. Valvassori, Jair C. Soares.

1. Transtorno bipolar – Tratamento. 2. Lítio – Uso terapêutico. 3. Celecoxib – Uso terapêutico. 4. Citocinas. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 615.1



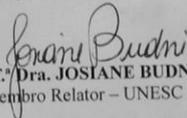
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

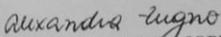
## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Paula Teresinha Tonin** sob o título **“EFEITOS DO TRATAMENTO ADJUNTO DE LÍTIO COM CELECOXIB SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO MANÍACO, NÍVEIS DE CITOCINAS E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA DOPAMINÉRGICA”**, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

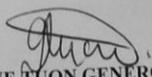
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

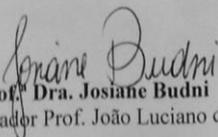
Criciúma, SC, 10 de abril de 2017.

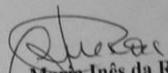
  
Prof.ª **Dra. JOSIANE BUDNI**  
Membro Relator – UNESC

  
Prof.ª **Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**  
Membro Interno – UNESC

  
Prof.ª **Dra. JUCÉLIA JEREMIAS FORTUNATO**  
Membro Externo - UNISUL

  
Prof.ª **Dra. LISIANE TUON GENEROSO BITTENCOURT**  
Membro Externo – UNESC

  
Prof.ª **Dra. Josiane Budni**  
Rep. do Orientador Prof. João Luciano de Quevedo

  
Prof.ª **Dra. Maria Inês da Rosa**  
Coordenadora do PPGCS



## **Folha informativa**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada de forma tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.



*Dedico à minha família, não seria nada sem eles.*



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por ter me dado a vida, sempre me protegendo, guiando e iluminando meus caminhos!

Ao meu pai Enio e minha Mãe Claer, pelo exemplo de pais, por todo amor, carinho, esforço, dedicação e incentivo, o meu muito obrigada! Meus maiores orgulhos, com certeza! Não seria nada sem a ajuda de vocês!

O meu irmão Alexandre, pelo carinho, atenção, pelos muitos ensinamentos, nunca mediu esforços para me ajudar...meu espelho! Muito, muito obrigada!

Ao meu amado esposo Júnior, pelo carinho, amor, paciência, dedicação, companheirismo e, principalmente, por me incentivar e acreditar em mim, muito obrigada vida minha!

Aos meus avós Oria e Alberto (in memoriam), a quem eu devo muito do que sou hoje, exemplo de pessoas, obrigada por tudo!

Não poderia deixar de agradecer aos meus “bichanos” Fred (meu grudinho) e Tobias, meus eternos companheirinhos!

Ao meu Orientador, Prof. Dr. João Quevedo, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional, muito obrigada!!

A minha Co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Samira S. Valvasori, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, amizade, por sempre me incentivar e, principalmente, acreditar em mim! Muito obrigada, Sá!

Aos demais colegas de Laboratório, em especial, Roger B. Varela, meu “padrinho” na ciência, obrigada por sempre me ajudar e incentivar! A Amanda V. Steckert, Lara Canever, Ândrea Ramos, Zuleide Inácio, Amanda Maciel, Daniela Bavaresco...pela amizade e pela ajuda sempre que precisei, contem sempre comigo! À todos os alunos de iniciação científica, pelo trabalho em equipe e pela amizade, em especial, Camila Leite Ferreria, Fernanda Gava, Bruna Peterle, Edmilson Mariot, Gabriela Nadas e Guilherme Bianchini.

Não poderia deixar de agradecer à minha amiga Priscila Cassolla, que em pouco tempo se tornou uma pessoa muito especial, obrigada por tudo, Prrr! E a Luciana Wolleschllager, minha “segunda mãe” em SC, uma pessoa muito especial e que esteve presente em muitos momentos, muito obrigada!

A todos os meus amigos, aos que sabem que são amigos, os de perto ou distantes, aos novos, aos velhos, obrigada por sempre me apoiarem e torcerem por mim!

Por fim, gostaria de agradecer todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído, obrigada pelo



carinho, pela compreensão, pela paciência e principalmente pela força nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Meu eterno OBRIGADA!



*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”*

*Simone de Beauvoir*



## Resumo

O Transtorno bipolar (TB) é um transtorno crônico considerado um grave problema de saúde pública. Apesar de sua importância, a sua fisiopatologia ainda é pouco conhecida, dificultando o desenvolvimento de novos fármacos para o seu tratamento. Recentemente, vários estudos têm sugerido que a fisiopatologia do TB pode estar relacionada com alterações do sistema imune e com o estresse oxidativo. O Lítio (Li) é um estabilizador de humor considerado padrão ouro para o tratamento do TB, porém, devido aos efeitos colaterais causados por este fármaco, muitos pacientes acabam abandonando o tratamento, o que acaba agravando os sintomas. Estudos prévios demonstram que o celecoxib (Cel), um anti-inflamatório inibidor seletivo da ciclo-oxigenase 2 (Cox-2), pode ser efetivo para o tratamento da depressão e do TB. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento associado de Li com Cel sobre o comportamento, níveis de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina (d-AMPH). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, os quais foram submetidos à administração i.p de d-AMPH (2 mg/kg) ou salina (Sal) durante 14 dias, uma vez por dia. Entre o oitavo e o décimo quarto dia os animais do grupo d-AMPH e do grupo Sal foram tratados por gavagem com Li (24 mg/kg), Cel (20 mg/kg), Li + Cel ou água. Foram avaliados os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, TNF $\alpha$ ) e parâmetros de estresse oxidativo [espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonil, catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) ] no cérebro e soro destes animais. Os resultados demonstraram que a d-AMPH induziu hiperlocomoção nos animais e que o tratamento adjunto com Li + Cel foi capaz de reverter este comportamento. Além disso, a d-AMPH aumentou a expressão de IL-4, IL-10 e TNF $\alpha$  no soro e cérebro dos animais, e o tratamento conjunto de Li + Cel foi capaz de reverter este aumento. A d-AMPH também aumentou os níveis de TBARS e de grupamentos carbonila no cérebro dos animais e tanto os tratamentos isolados com Li e Cel, quanto o tratamento associado de Li + Cel foram capazes de reverter este aumento. A d-AMPH causou uma redução na atividade da CAT e o tratamento adjunto com Li + Cel conseguiu reverter esta diminuição. A d-AMPH aumentou a atividade da GPx no córtex frontal e o tratamento com Li ou Cel isolados ou associados reverteram este aumento. No hipocampo, houve um aumento na atividade da GPx no grupo d-AMPH+Li+Cel. Juntos, esses resultados indicam que sistema imune inflamatório e o estresse oxidativo podem estar envolvidos na



fisiopatologia do TB e que o tratamento associado de Li + Cel pode ser um novo potencial terapêutico para o tratamento de TB.

**Palavras chave:** transtorno bipolar, citocinas, modelo animal de mania, estresse oxidativo, d-anfetamina.



## Abstract

Bipolar disorder (BD) is a chronic disorder considered a serious public health problem. Despite its importance, the pathophysiology of this disorder is still little known, making it difficult to develop new drugs for the treatment of it. Recently, several studies have suggested that the pathophysiology of BD may be related to changes in the immune system and also related with oxidative stress. Lithium (Li) is a mood stabilizer considered a gold standard for the treatment of BD; however, due to its side effects, many patients end up abandoning the treatment and aggravating the symptoms of the disorder. Previous studies have shown that celecoxib (Cel), an anti-inflammatory selective inhibitor of cyclooxygenase 2 (Cox-2), may be effective in treating depression and BD. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of adjunct Li treatment with Cel on parameters of behavior, cytokine levels and oxidative stress biomarkers in an animal model of mania induced by d-AMPH. For this purpose, adult Wistar rats were used as animal model. They received, intraperitoneally (i.p.) 2 mg/kg of dextroamphetamine (d-AMPH) or Salt for 14 days, once a day. Between the eighth and the fourteenth day the animals of the d-AMPH group and the Salt group were treated by gavage with Li (24 mg/kg), Cel (20 mg/kg) or Li + Cel or water. We evaluated levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, TNF $\alpha$ ) and oxidative stress biomarkers [TBARS, carbonyl, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)] in brain and serum of these animals. Our results demonstrated that d-AMPH induced hyperlocomotion in the animals and that the adjunct treatment with Li + Cel was able to reverse this behavior. In addition, d-AMPH increased the expression of IL-4, IL-10 and TNF $\alpha$  in the serum and brain of these animals, and treatment Li + Cel was able to reverse this increase. d-AMPH also increased levels of TBARS and carbonyl groups in brain samples of rats and both, Li and Cel, and Li + Cel treatments were able to reverse these increases. d-AMPH produced a reduction in CAT activity and the adjunct treatment, with Li + Cel, was able to reverse this decrease. d-AMPH also increased the activity of GPx in the frontal cortex and treatment with Li or Cel, in single dose, as well as the combination of Li + Cel reversed this increase. In the hippocampus samples, there was an increase in GPx activity in the d-AMPH + Li + Cel group. In conclusion, we are able to say that inflammatory immune system and oxidative stress may be involved in the pathophysiology of BD, as well as the adjunctive treatment of Li + Cel may be a new potential therapeutic protocol in BD treatment.



**Key words:** bipolar disorder, cytokines, animal model of mania, oxidative stress, amphetamine.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico  
AINES – Anti-inflamatórios não-esteróides  
AMPH - Anfetamina (do inglês amphetamine)  
ANOVA – Análise de variância simples (do inglês analysis of variance)  
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês brain-derived neurotrophic factor)  
CAT - Catalase  
CBZ - Carbamazepina  
Cel - Celecoxib  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
COX – Ciclo-oxigenase  
DA - Dopamina  
d-AMPH - Dextroanfetamina (do inglês Dextroamphetamine)  
DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)  
GBP – Gabapentina  
GPx – Glutathione peroxidase  
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal  
IL - Interleucina  
IP - Injeção intraperitoneal  
LEV - Levetiracetam  
LTG - Lamotrigina  
Li - Lítio (do inglês lithium)  
LTG - Lamotrigina  
MDA - Malondialdeído  
NGF - Fator de crescimento neural (do inglês nerve growth factor)  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PG – Prostaglandina  
PLA2 - Fosfolipase A2 (do inglês phospholipases)  
ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês reactive oxygen species)  
SNC – Sistema nervoso central  
sTNFR1 - Receptor solúvel de TNF do tipo 1  
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês Thiobarbituric acid reactive substances)  
TGB - Tiagabina  
TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês Tumor necrosis factor)  
TPM - Topiramato  
TXA - Tromboxano  
VPA - Valproato



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Mecanismos de ação da COX-1 e COX-2 e a inibição pelo uso de AINES.....	35
<b>Figura 2:</b> Desenho experimental.....	41
<b>Figura 3:</b> Resultados do teste do <i>open-field</i> .....	45
<b>Figura 4:</b> Concentração de TNF $\alpha$ no soro (4A), no córtex frontal (4B) e estriado (4C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	46
<b>Figura 5:</b> Concentração de IL-1 $\beta$ no soro (5A), no córtex frontal (5B) e estriado (5C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	47
<b>Figura 6:</b> Concentração de IL-4 no soro (6A), no córtex frontal (6B) e estriado (6C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	48
<b>Figura 7:</b> Concentração de IL-10 no soro (7A), no córtex frontal (7B) e estriado (7C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	49
<b>Figura 8:</b> Concentração de TBARS no soro (8A), no córtex frontal (8B) e hipocampo (8C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	50
<b>Figura 9:</b> Concentração de Proteínas Carboniladas no soro (9A), no córtex frontal (9B) e hipocampo (9C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	51
<b>Figura 10:</b> Atividade enzimática da Catalase no soro (10A), no córtex frontal (10B) e hipocampo (10C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	52
<b>Figura 11:</b> Atividade enzimática da Glutathione Peroxidase no soro (11A), no córtex frontal (11B) e hipocampo (11C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg).....	53



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR .....	29
1.2 TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR.....	30
1.3 TRANSTORNO BIPOLAR E INFLAMAÇÃO .....	31
1.4 CELECOXIB.....	33
1.5 TRANSTORNO BIPOLAR E O ESTRESSE OXIDATIVO .....	35
1.6 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR D-AMPH.....	37
1.7 JUSTIFICATIVA .....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	40
3.2 DROGAS UTILIZADAS .....	40
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	40
3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	41
<b>3.4.1 Tarefa de campo aberto</b> .....	<b>42</b>
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	42
<b>3.5.1 Preparo das amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5.2 Avaliação dos níveis de IL-1<math>\beta</math>, IL-4, IL-10 E TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>42</b>
<b>3.5.3 Avaliação de Parâmetros de estresse oxidativo</b> .....	<b>42</b>
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	44
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	45
4.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	45
4.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	49
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>REFÊRENCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>79</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) caracteriza-se por um transtorno crônico que afeta aproximadamente 1,5% da população, seu curso é crônico e recorrente, os pacientes acometidos por ele apresentam episódios maníacos, hipomaníacos e depressivos, bem como episódios mistos (Judd e Akiskal, 2003; Merikangas et al., 2007). Um estudo mostrou que o risco de desenvolver o TB é maior em adultos jovens, e que pelo menos metade dos casos iniciam antes dos 25 anos (Kesller et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) faz uma previsão para o ano de 2020 colocando o TB como a sexta causa médica de incapacidade (Lopes e Murray, 1998).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM-V, caracteriza pacientes com TB do tipo I, TB do tipo II e ciclotimia. Alternância entre os estados de humor maníaco e depressivo corresponde ao TB I, enquanto a hipomania ao TB II. O TB do tipo II é o de maior incidência na população, respondendo por 5%, enquanto o TB I representa 1% (Barbosa et al., 2009). A característica principal do transtorno é a mania que, dependendo da gravidade, apresenta manifestações como euforia, energia exacerbada, grandiosidade e uma sensação de prazer intenso, podendo alternar ao um estado altamente irritável e agressivo (Calabrese et al., 2003).

É importante salientar que os índices de comorbidade são altos em pacientes com TB, podendo variar de 30 a quase 100%, dependendo da metodologia e amostra utilizada no estudo (Bauer et al., 2005). As comorbidades comumente encontradas em indivíduos com TB são as relacionadas a problemas circulatórios, diabetes mellitus, obesidade e doenças respiratórias (McIntyre et al., 2007; Barbosa et al., 2014). O abuso de substâncias e a ocorrência de transtornos de ansiedade também são comuns dentre estes pacientes (Sanchez et al., 2005; Amério et al., 2015).

Apesar da baixa frequência (em torno de 2% da população), sua influência na vida dos indivíduos resulta em um sério problema de saúde pública. Em relação aos riscos de mortalidade, estudos mostram altas taxas de suicídio entre os portadores deste transtorno (Santin et al., 2005; Amério et al., 2015).

O tratamento clássico usado para pacientes com TB é carbonato de Lítio (Li) e anticonvulsivantes como o valproato de sódio (VPA). Ambos podem ser usados como estabilizadores de humor e servem para

prevenir em longo prazo as recorrências dos episódios (Baldessarini, 2006).

Apesar de todos os avanços ao longo dos anos em relação a este transtorno, a sua fisiopatologia não está totalmente compreendida, porém algumas teorias têm sido propostas. Vários estudos demonstraram um aumento do estresse oxidativo e alterações em enzimas antioxidantes em pacientes com TB (Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004; Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andrezza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011). Outros estudos também têm relacionado o possível envolvimento de neurotrofinas, em particular o fator neurotrófico derivado do e do fator de crescimento neural com possível envolvimento na fisiopatologia do TB (Shaltiel et al., 2007; Kapczinskiet al., 2009; Soontornniyomkij et al., 2011; Thompson Ray et al., 2011; Huang et al., 2012). Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado o possível papel do sistema imune na fisiopatologia do TB (Barbosa et al., 2009; Mc Namara e Lotrich, 2012; Barbosa et al., 2014; Valvassori et al., 2015).

## 1.2 TRATAMENTO DO TRANSTORNO BIPOLAR

O tratamento de indivíduos com TB ainda constitui uma tarefa altamente complexa, antes de tudo, por envolver estratégias distintas nos diferentes estágios desse transtorno (Ketter et al., 2016). O uso de antidepressivos podem causar mania ou hipomania em pacientes bipolares, já os tratamentos que agem sobre os episódios maníacos, em alguns casos, podem levar a depressão (Geddes e Miklowitz, 2013).

O Li é ainda é considerado o fármaco padrão ouro para pacientes com TB e o único aprovado especificamente para o transtorno, sendo utilizado por mais de 50 anos para o tratamento das fases aguda e de manutenção do tratamento. É indicado para os episódios de mania aguda, em particular para mania eufórica e hipomania, sendo eficaz também para comportamento suicida. Entretanto, o uso deste fármaco requer cuidados especiais, pois a sua retirada abrupta pode levar a maiores chances de recaída e suicídio (Kapczinski e Quevedo, 2009; Kapczinski e Quevedo, 2016).

A associação do Li com anticonvulsivantes têm sido muito utilizadas na prática clínica, dentro deste contexto apresenta-se o VPA e a carbamazepina (CBZ), ambos com propriedades antimaníacas, sendo os mais indicados para a fase maníaca do TB. Seus mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos. O que até o momento se sabe é que tais mecanismos estão envolvidos na modulação de múltiplos sistemas

reguladores de neurotransmissores e cascatas de sinalização intracelulares (Niciu et al., 2013). Contudo, assim como acontece com o Li, eles também apresentam alguns inconvenientes, pois não são eficazes para todos os pacientes, apresentam risco de teratogenicidade e necessitam de constante monitorização terapêutica. Além dos fármacos citados, a gabapentina (GBP), lamotrigina (LTG), levetiracetam (LEV), tiagabina (TGB) e topiramato (TPM) também estão entre os outros fármacos utilizados na clínica para pacientes com TB (Kapczinski e Quevedo, 2009).

Apesar de existir um significativo número de fármacos para a terapêutica, o grande desafio do tratamento está na fase depressiva do transtorno, pois, o uso de antidepressivos possui um risco muito grande no desencadeamento de episódio maníaco. Assim, os antidepressivos mais utilizados na prática clínica atual são os inibidores da recaptação de serotonina e a bupropiona, um inibidor da recaptação de dopamina (DA) (Sachs et al., 2000; Post et al., 2006).

Como mencionado acima, o arsenal terapêutico atual parece animador a primeira vista, levando em consideração a quantidade de fármacos que podem ser utilizados para o tratamento do TB (estabilizadores de humor, antidepressivos, antipsicóticos e anticonvulsivantes), no entanto, muitas lacunas ainda estão abertas, principalmente em se tratando das fases distintas observadas no transtorno. Outros fatores inconvenientes encontrados são a resistência de alguns sintomas ao tratamento, a baixa adesão devido aos efeitos colaterais, tais como, aumento de peso, poliúria, problemas dermatológicos, fadiga, bradicinesia, problemas sexuais (Rosa et al., 2006; Cheniaux, 2011). É importante salientar que o Li, em vista da dose utilizada e apesar de seus inúmeros efeitos colaterais (ganho de peso, fadiga e poliúria), ainda continua sendo a primeira e mais indicada opção de tratamento, pois é considerado o fármaco mais eficaz nos sintomas do TB.

Em termos de perspectivas, há uma grande variedade de estratégias terapêuticas em desenvolvimento, mas que ainda precisam de estudos mais aprofundados. O principal desafio farmacológico atual para o tratamento do TB é estratégia farmacológica para os dois polos do transtorno (Ribeiro et al., 2005). Diante desta realidade, ainda se encontra muitas dificuldades em relação ao tratamento do TB, visto que, a maioria deles tratam apenas dos sintomas do transtorno. Isso justifica a importância de maiores pesquisas na busca de novos fármacos.

### 1.3 TRANSTORNO BIPOLAR E INFLAMAÇÃO

O papel da inflamação como parte constituinte de várias doenças, como as doenças cardiovasculares, diabetes e câncer, tem evoluído bastante desde a última década e vem sendo um novo alvo de pesquisa para neurologia e a psiquiatria. Desde então, estudos envolvendo o sistema imune e os transtornos psiquiátricos, tais como os transtornos de humor, de ansiedade e esquizofrenia vêm ganhando cada vez mais destaque (Miller et al., 2013).

As citocinas são importantes mediadores inflamatórios produzidos pelas células do sistema imune (células T, natural killer (NK), monócitos/macrófagos e células dendríticas) (Oliveira et al., 2007). Também podem ser produzidas por células do sistema nervoso, particularmente pela microglia e pelos astrócitos (Goncharova e Tarakanov, 2007; Muller e Schwarz, 2010).

São mediadores indispensáveis para a condução da resposta inflamatória, porém, um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias a partir de uma lesão podem acarretar em uma instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Perante uma impossibilidade de se classificar as citocinas quanto a sua célula de origem ou quanto a sua função, as mesmas foram agrupadas em interleucinas (IL), numeradas em uma sequência que vai de 1 a 35 (Oliveira et al., 2011).

A primeira hipótese do papel do sistema imune na fisiopatologia de alguns transtornos de humor ocorreu na década de 1990. Smith (1991) propôs a teoria dos macrófagos para a depressão, associando a depressão com a secreção excessiva de citocinas por estas células. Desde então, inúmeras pesquisas têm demonstrado o papel dos processos imunológicos em diversos transtornos psiquiátricos. No entanto, não é totalmente esclarecido se a ativação de vias inflamatórias no sistema nervoso central (SNC) origina-se na periferia ou diretamente do cérebro, induzidas por algum tipo de estresse. Mesmo assim, o papel das citocinas no SNC e na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos é reconhecido e tem alguns possíveis mecanismos envolvidos, como por exemplo, citocinas podem influenciar na síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores e monoaminas (serotonina, norepinefrina, dopamina e glutamato); citocinas podem influenciar no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) através do feedback negativo e/ou a perturbação na função dos receptores de glicocorticóides; citocinas podem influenciar na plasticidade neuronal e diminuir a expressão de BDNF no hipocampo (Felger et al., 2007; Miller et al., 2009).

Recentemente um estudo realizado por Louveau e colaboradores (2015), descobriu a existência de um sistema linfático revestindo os

seios durais no cérebro. A descoberta deste sistema linfático no SNC lança uma nova luz sobre a etiologia das doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas associada com a disfunção do sistema imunológico (Loveau et al., 2015).

Há um crescente número de dados mostrando que o TB está associado a uma inflamação crônica de baixo grau. Um aumento de citocinas pró-inflamatórias foram consistentemente relatados em pacientes bipolares, em particular, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e receptor solúvel de TNF do tipo 1 (sTNFR1) (Barbosa et al., 2011; Modabbernia et al., 2013; Munkholm et al., 2013). Ainda que haja vários estudos correlacionando o TB a alterações imunológicas, os dados ainda são inconstantes, ressaltando a importância de mais pesquisas nesta área (Barbosa et al., 2009).

#### 1.4 CELECOXIB

A classe de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) já é bem conhecida pela humanidade há mais de 100 anos, sendo estes os agentes farmacológicos mais utilizados na prática clínica. Tendo um amplo espectro de indicações terapêuticas, tais como: ação analgésica, anti-inflamatória, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares (Dubois et al., 1998).

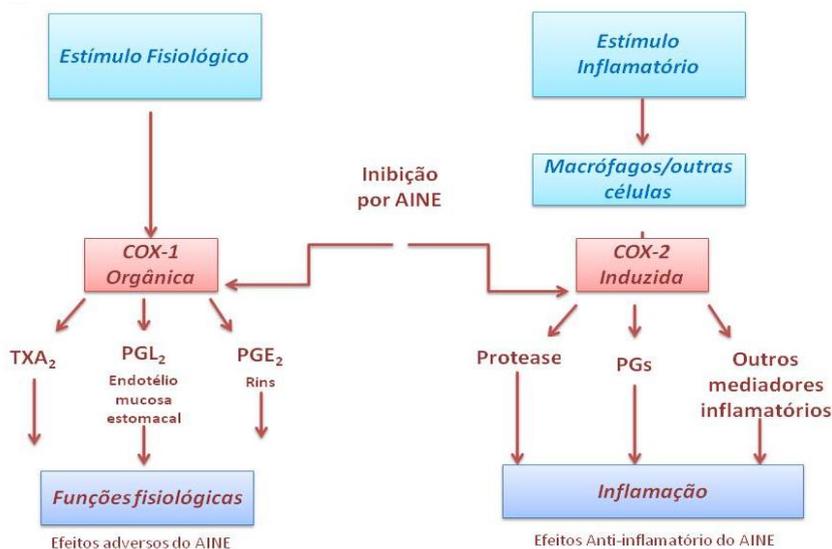
Quando se fala em AINES é preciso saber qual o seu mecanismo de ação, frente a isso, deve-se entender um pouco mais sobre as ciclooxigenases (COX) (Figura 1). Apesar de a COX ter sido descoberta há mais de 20 anos, foi na última década que ocorreu um maior progresso no entendimento das suas funções. O termo COX deriva da hipótese de o seu mecanismo de ação consistir na formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) oriundos da oxigenação de ácidos graxos polinsaturados (Marnett et al., 1999). A ativação da COX envolve a síntese das prostaglandinas (PGs) e a partir do ácido araquidônico (AA) formado pela fosfolipase A2 (PLA2) de fosfolipídios da membrana (Brooks et al., 1999). A enzima COX apresenta duas isoformas intituladas COX-1 e COX-2. A COX-1 é fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica, responsável pela homeostase renal e plaquetária, já a COX-2 é considerada indutiva, surgindo apenas em situações de trauma tissular e infecções (Perazella e Tray, 2001; Yaksh et al., 2001).

Quando um determinado anti-inflamatório inibe apenas a isoforma COX-2, sem que haja nenhuma intervenção na atividade da COX-1, designa-se agente inibidor específico COX-2. Estes compostos

foram então denominados coxibs. Sendo que, o Celecoxib (Cel) foi o primeiro composto a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para comercialização nos Estados Unidos (Whelton, 2001). Pelo fato de não atuarem na COX-1, os coxibs foram introduzidos como uma classe alternativa de AINES de eficácia similar, porém, com um menor índice de efeitos colaterais que os tradicionais AINES (Cannon e Breedveld, 2001).

Estudos mostram o papel das PGs como mediadoras da febre, reações anti-inflamatórias no tecido neural e também na função cerebral (Dubois et al., 1998; Lipsky, 2000). Os níveis de COX-2 mostraram-se aumentados após convulsões e atividade mediada pelo receptor NMDA (Dubois et al., 1998). Ainda é preciso uma maior investigação acerca do papel da COX-2 e seus inibidores, no entanto, estudos evidenciam que altas doses de AINES podem estar associadas à reversão de déficits cognitivos em idosos. Ao mesmo tempo em que o seu uso prolongado e em baixas doses parece prevenir o declínio da função cognitiva (Karplus e Saag, 1998).

Alguns estudos utilizando o tratamento com Cel demonstraram-se eficazes em pacientes com depressão (Chen et al., 2010; Abbasi et al., 2012). O mesmo fármaco também demonstrou eficácia como terapia adjuvante no tratamento de episódios maníacos, depressivos e/ou mistos (Nery et al., 2008; Arabzadeh et al., 2015). Tendo em vista esses resultados, considera-se de grande importância as pesquisas envolvendo o uso de anti-inflamatórios como um possível novo alvo terapêutico para o TB.



**Figura 1:** Mecanismos de ação da COX-1 e COX-2 e a inibição pelo uso de AINES (Adaptado de Carvalho e Lemônica, 1998). COX – Ciclo oxigenase; AINES - anti-inflamatórios não esteroides; TXA – Tromboxano A<sub>2</sub>; PG – Prostaglandina.

## 1.5 TRANSTORNO BIPOLAR E O ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de radicais livres se caracteriza por um processo contínuo e fisiológico, desempenhando funções biológicas relevantes. Ao longo dos processos metabólicos, esses radicais trabalham como mediadores transferindo elétrons nas várias reações bioquímicas que acontecem de forma natural no organismo humano. A sua produção, quando de forma adequada, gera adenosina trifosfato - ATP (energia), através do transporte de elétrons; ativação de genes; e participação em mecanismos de defesa durante o processo de inflamação. No entanto, a produção excessiva destes radicais livres pode conduzir a danos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Nyska e Kohen, 2002; Shami e Moreira, 2004).

Essa produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos resultou em um mecanismo de defesa antioxidante, a qual tem como principal objetivo limitar os níveis celulares destes radicais livres, controlando a ocorrência de danos decorrentes (Bianchi e

Antunes, 1999; Shami e Moreira, 2004). O estresse oxidativo nada mais é do que um desequilíbrio entre a produção de compostos oxidantes e antioxidantes, caracterizada pela excessiva produção de radicais livres e uma redução na remoção desses. O processo em questão tem relevante implicação sobre a etiologia de muitas enfermidades crônicas, como a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (Green et al., 2004; Halliwell e Whiteman, 2004).

Existe um grande número de trabalhos publicados relacionando o estresse oxidativo com a psiquiatria (Benes et al., 2003; Migliore et al., 2005; Kunz et al., 2008; Chittiprol et al., 2009; Stefanescu e Ciobica, 2012). Provavelmente esteja relacionado à sensibilidade cerebral ao dano oxidativo (Ng et al., 2008). O cérebro é extremamente sensível ao estresse oxidativo, principalmente por consumir uma alta taxa de oxigênio e possuir poucas defesas antioxidantes, bem como a sua rica constituição lipídica, o que favorece o dano (Andersen, 2004; Ng et al., 2008).

Muitos estudos também têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo com o TB (Frey et al., 2006a; Halliwell, 2006; Andrezza et al., 2009; Berk et al., 2011; Jornada et al., 2011). A principal hipótese envolve distúrbio na função mitocondrial, visto que a mitocôndria é essencial para a formação de energia, requerendo uma grande quantidade para que se mantenha o equilíbrio celular neuronal (Nicholls e Budd, 2000; Berk et al., 2011). Estudos clínicos mostram um alto dano oxidativo sistêmicos em pacientes com TB (Andrezza et al., 2007; Kapczinski et al., 2011). Os sistemas antioxidantes também parecem estar alterados nos pacientes bipolares, demonstrando aumentos significativos nos sistemas da glutatona e da superóxido dismutase (Andrezza et al., 2007; Andrezza et al., 2009), sugerindo um mecanismo compensatório entre o estado pró-oxidativo existente. Além disso, estudos realizados no mesmo laboratório da presente tese, demonstraram que o estresse oxidativo induzido pela AMPH também é capaz de ser revertido e prevenido pelos estabilizadores do humor Li e VPT (Frey et al., 2006b)

Apesar de serem estudadas de forma separadas, as vias metabólicas e imunes são interdependentes, pois hormônios, citocinas, fatores de transcrição e proteínas de sinalização agem nessas duas vias, buscando a homeostase do organismo. Uma resposta inflamatória entendida como normal será acompanhada de alterações metabólicas e do recrutamento dos estoques de energia, em especial de lipídios, visando a supressão do estímulo inflamatório (Geraldo et al., 2009).

De maneira geral, todos os resultados em conjunto apoiam a hipótese do papel do estresse oxidativo na fisiopatologia do TB, justificando a importância da pesquisa na busca de novos alvos terapêuticos.

## 1.6 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR D-AMPH

O desenvolvimento de modelos animais constitui uma ferramenta importante para o estudo dos quadros de humor, tanto para elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia quanto para a obtenção de novas terapias farmacológicas (Frey et al., 2006a). O padrão oscilatório do TB dificulta o desenvolvimento de modelos adequados, que possam abranger todos os polos do mesmo. Como o marco clínico do TB são os sintomas maníacos, o foco maior está em desenvolver modelos animais que possam reproduzir a manifestação de episódios maníacos, com sintomas como euforia, irritabilidade, hiperatividade, insônia ou atividade sexual aumentada (Ellenbroek e Cools, 1990; Belmaker e Bersudsky, 2004; Valvassori et al., 2013).

Para que um modelo animal possa ser considerado válido, deve apresentar três características essenciais: o modelo precisa mimetizar os sintomas da doença (validade de face), ser hábil em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença (validade de constructo); e, finalmente, os agentes terapêuticos usados no tratamento devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva) (Ellenbroek e Cools, 1990).

As AMPHs são potentes estimulantes do SNC, a nível cerebral sua ação se dá pelo aumento do fluxo de dopamina (DA), inibição da recaptação da DA, bem como a atividade da monoamina oxidase (da Rosa et al., 2012). É bem descrito na literatura que a AMPH induz sintomas maníacos em pacientes com TB (Joyce et al., 1995). Estudos utilizando ratos tratados com AMPH demonstraram que a administração desta droga induz hiperlocomoção, alteração das fases do sono e comportamento de risco nestes animais, sintomas que se assemelham ao comportamento do tipo maníaco (Frey et al., 2006a,b; Einat 2007; Nestler e Hyman, 2010). Além disso, o tratamento com estabilizadores de humor como o Li e o VPA, foram capazes de reverter esta hiperlocomoção (Frey et al., 2006a; Yatham et al., 2013).

Como o marco clínico para o diagnóstico de TB é a presença dos sintomas maníacos, um modelo adequado deveria assemelhar-se a algumas características de um episódio maníaco, assim, o modelo animal de mania induzido pela AMPH, embora contemple apenas a um

polo da doença, ainda é o modelo mais útil para estudar o TB (Valvassori et al., 2013). Além disso, a administração de AMPH é considerada um modelo animal de mania válido, visto que contempla as três validades exigidas (Cappeliez e Moore 1990; Einat et al., 2007; Young et al., 2010). Deste modo, é de suma importância que sejam realizadas mais pesquisas envolvendo este modelo, o que pode contribuir para uma maior compreensão da fisiopatologia e possíveis novos alvos terapêuticos para o transtorno.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Embora o TB venha ganhando destaque entre os transtornos psiquiátricos e muito já se tem estudado a seu respeito nos últimos anos, não se obteve muita evolução desde a sua descoberta em relação ao tratamento farmacológico, principalmente pelo pouco que se conhece sobre a sua fisiopatologia. Levando em consideração que resultados anteriores demonstraram uma possível relação entre o TB o sistema imune e/ou o estresse oxidativo e, tendo em vista o atual cenário do transtorno, o presente estudo se faz importante para avaliar o potencial terapêutico de anti-inflamatórios associados ao Li para o tratamento de mania em um modelo animal induzido por d-AMPH.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento associado de Li com Cel sobre o comportamento do tipo maníaco, níveis de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do tratamento de Li, de Cel ou do tratamento adjunto de Li com Cel sobre a atividade locomotora e exploratória de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, através do teste de campo aberto.

- Avaliar os efeitos de Li, de Cel ou do tratamento adjunto de Li com Cel sobre os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, TNF $\alpha$ ) no soro e no cérebro (córtex frontal e estriado) de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

- Avaliar os efeitos de Li, de Cel ou do tratamento adjunto de Li com Cel sobre o parâmetro de dano oxidativo a lipídio (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) no soro e no cérebro (córtex frontal e hipocampo) de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

- Avaliar os efeitos de Li, de Cel ou do tratamento adjunto de Li com Cel sobre parâmetro oxidação protéica (carbonilação de proteínas) no soro e no cérebro (córtex frontal e hipocampo) de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

- Avaliar os efeitos de Li, de Cel ou do tratamento adjunto de Li com Cel sobre a atividade de enzimas antioxidantes (CAT e GPx) no soro e cérebro (córtex frontal e hipocampo) de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O estudo foi executado dentro das diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal): Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos. Os experimentos foram iniciados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) (protocolo nº 056/2015-2, anexo).

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos adultos (pesando 250-350 g), obtidos a partir da colônia de reprodução da UNESC. Os animais foram alojados em cinco por gaiola, com comida e água disponível à vontade e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes ligadas às 7h) à temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Todos os experimentos foram realizados no mesmo horário, durante o dia, para evitar as variações circadianas.

#### 3.2 DROGAS UTILIZADAS

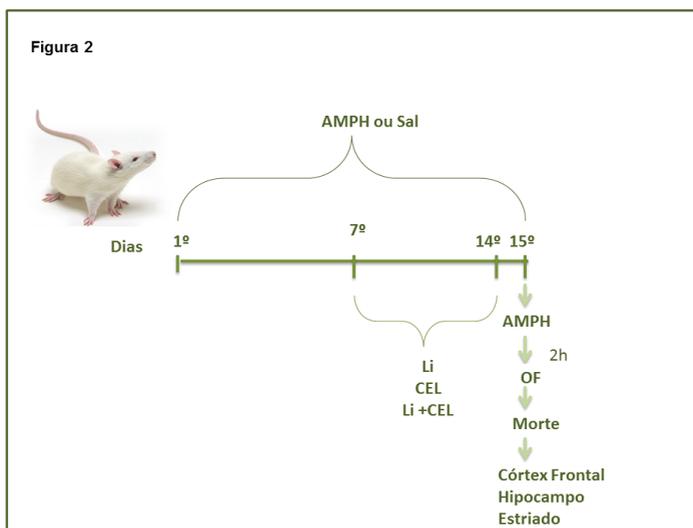
A d-AMPH foi obtido da Sigma Chemical (Saint Louis, EUA), o carbonato de Li da Eurofarma (São Paulo, Brasil) e o CEL da Getz Pharma (Karachi, Paquistão). A d-AMPH foi diluída em solução salina (Sal, 0,9%) para a administração intraperitoneal (i.p). Os comprimidos de carbonato de Li e de CEL foram macerados até obter-se pó e suspensos em água para administração por gavagem. As suspensões foram agitadas em agitador magnético durante todo o período de administração para que não houvesse alterações significativas na concentração.

#### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos à administração i.p de d-AMPH (2 mg/kg) ou Sal durante 14 dias, uma vez por dia. Entre o oitavo e o décimo quarto dia os animais do grupo d-AMPH e do grupo Sal foram tratados por gavagem com Li (24 mg/kg), Cel (20 mg/kg) ou Li + Cel ou água. O Li foi administrado duas vezes por dia com um intervalo de 12h entre as administrações e o Cel foi administrado uma vez ao dia. No décimo quinto dia, os animais receberam uma administração i.p de d-AMPH ou Sal e duas horas depois foram submetidos ao teste de campo

aberto (ver Figura 2). A seguir os grupos experimentais: 1) Sal+Água; 2) Sal+Li; 3) Sal+Cel; 4) Sal+Li+Cel; 5) d-AMPH+Água; 6) d-AMPH+Li; 7) d-AMPH+Cel; 8) d-AMPH+Li+Cel. Foram utilizados 10 animais por grupo para a realização do presente estudo.

**Observação 1:** As doses do Cel e da d-AMPH foram baseadas em estudos prévios (Frey et al., 2006a, Kaizaki et al., 2013). A dose de Li utilizada neste estudo foi a metade da dose administrada no estudo de Frey e colaboradores (2006a). A escolha pela metade da dose teve o intuito de avaliar a eficácia deste fármaco associado a um anti-inflamatório. **Observação 2:** Os ratos que não receberam a associação de Li + Cel ou apenas Li (que é administrado duas vezes ao dia) receberam uma injeção de veículo equivalente (água) no lugar, para que todos os animais fossem submetidos ao mesmo tipo de manipulação.



**Figura 2:** Desenho experimental. Os animais foram submetidos à administração de d-AMPH ou Sal durante 14 dias. Entre o oitavo e o décimo quarto dia os animais do grupo d-AMPH e do grupo Sal foram tratados por gavagem com Li, Cel ou Li + Cel. No décimo quinto dia, os animais receberam uma administração i.p de d-AMPH ou Sal e duas horas depois foram submetidos ao teste de campo aberto. Imediatamente após o teste comportamental os animais foram mortos, o sangue periférico coletado e o cérebro removido e dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado para posterior análise bioquímica.

### 3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

### **3.4.1 Tarefa de campo aberto**

A atividade comportamental foi avaliada através da tarefa de campo aberto (Open Field Test), sendo a hiperlocomção o parâmetro adotado como tipo-maníaco induzida no modelo animal. Esta é executada em uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada marrom, com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que explorem a arena por 5 minutos, onde foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas (crossings) e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (rearings) (Broadhurst, 1960).

## **3.5 ANÁLISESE BIOQUÍMICAS**

### **3.5.1 Preparo das amostras**

Após o teste comportamental, os ratos foram mortos por decapitação e o sangue periférico foi imediatamente coletado e refrigerado. As amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos e uma alíquota de soro foi armazenada em ultra-freezer a -80°C para posterior análise. O cérebro também foi removido e dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado, sendo armazenados em ultra-freezer a -80°C para posterior análise bioquímica.

### **3.5.2 Avaliação dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 E TNF- $\alpha$**

O estriado e o córtex frontal foram homogeneizados numa solução de extração, contendo aprotinina (100mg de tecido por 1 ml). A concentração de citocinas/quimiocinas foi determinada no soro, no estriado e no córtex frontal utilizando testes ELISA disponíveis no mercado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, sistemas de R & D; Minneapolis). Os resultados estão apresentados em pg / 100 mg de tecido no estriado e córtex frontal.

### **3.5.3 Avaliação de Parâmetros de estresse oxidativo**

#### **3.5.3.1 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para determinação dos níveis de TBA-RS, as amostras de tecidos cerebrais e do soro foram homogeneizadas em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma

reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EUA) 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3- tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS\*mg de proteína-1 (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

### 3.5.3.2 *Oxidação e nitração proteica*

Para determinação dos níveis de carbonila, as amostras cerebrais e de soro foram homogenizadas no tampão fosfato de sódio 20 mM + KCl 140 mM em pH 7,4. Essa mistura foi conservada em gelo e foram separadas em dois grupos, um intitulado como branco e outro como teste, sendo que o branco foi descontado do teste nas análises. Após centrifugar as amostras, adicionou-se TCA 20 % e o sobrenadante foi descartada. Foi adicionado no banco HCl 2 M e nas amostras testes dinitrofenilhidrazina, em seguida as amostras foram lavadas três vezes com Etanol e Acetato (1:1). O princípio do método se baseia na ligação e grupos carbonila a 2,4-dinitrofenilhidrazina formando hidrazonas alifáticas. A absorvância obtida através do espectrofotômetro em 340 nm zerando com o branco de cada amostra. Os resultados foram expressos como nmol de carbonilas /mg de proteína-1 (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

### 3.5.3.3 *Atividade enzimática da catalase (CAT)*

Esta atividade enzimática da catalase em amostras de tecidos cerebrais e de soro foram determinadas através do método de Aebi (1984). À amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia,USA) a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 3 minutos, medindo a cada 30 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 43,6

mM-1cm-1. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U.mg de proteína-1 (unidade de atividade da CAT por mg de proteína).

#### 3.4. 3.4 Atividade da glutatona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx em amostras de tecidos cerebrais e de soro foram determinados pelo método de Wendel (1981) usando hidroperóxido de tert-butila como substrato. Para cada amostra foi adicionado tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, azida sódica 40 mM, glutatona reduzida 100 mM, GR 10 U/mL e NADPH 10 mM. Esta mistura foi incubada a 25 °C durante 1 minuto, a fim de estabilizar o meio. Após a incubação, foi adicionado hidroperóxido de tert-butila 10 mM para iniciar a reação. Os brancos foram preparados substituindo-se a amostra pelo tampão fosfato supracitado. A queda da absorvância a 340 nm foi acompanhada durante 300 segundos em um leitor de placas SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia, USA) e a atividade da GPx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção do dinucleotídeo de fosfato de nicotinamida e adenina (NADPH) a 340 nm de 6,2 mM-1 cm-1. A atividade da GPx está expressa como U.mg de proteína-1(unidade de atividade da GPx por mg de proteína).

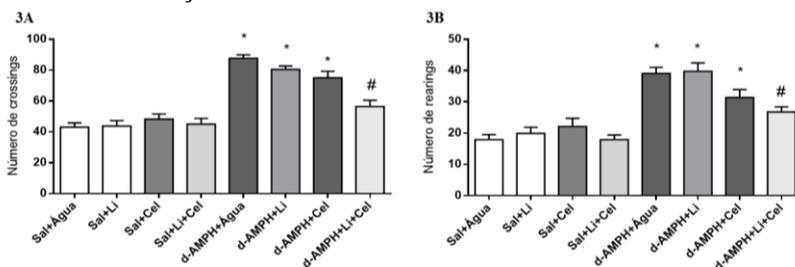
### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados estão representados como média e desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de três vias, seguido pelo teste post-hoc de Tukey quando necessário. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistica 7*. Para todos os cálculos, o nível de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Como pode-se observar na figura 3, a administração de d-AMPH aumentou a atividade locomotora (*crossings*, **Figura 3A**) e exploratória (*rearings*, **Figura 3B**) dos animais, considerados comportamentos do tipo maníacos. A administração de Li na dose de 24 mg/kg e Cel na dose de 20 mg/kg, isoladamente, não reverteram os comportamentos do tipo maníaco induzidos pela d-AMPH. Entretanto, a administração adjunta de Li + Cel reverteu os comportamentos do tipo maníacos induzidos pela d-AMPH. É importante salientar que a administração de Li + Cel no grupo pré-tratado com Sal não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais; portanto, podemos afirmar que os efeitos antimaníacos da administração associada dos dois fármacos não foram atribuídos à sedação.

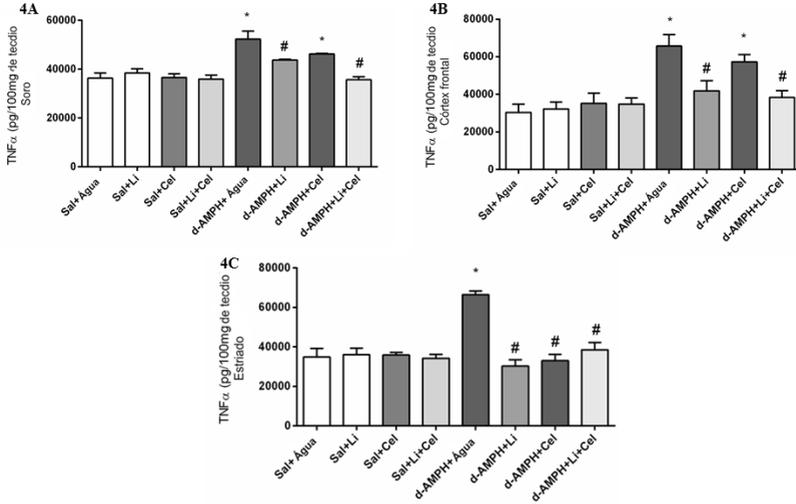


**Figura 3:** Resultados do teste do *open-field*. Pode ser observado os efeitos de Li (24mg/kg) de Cel (20mg/kg) ou a administração associada de Li+Cel sobre o número de crossings (A) e rearings (B) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH. Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

### 4.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

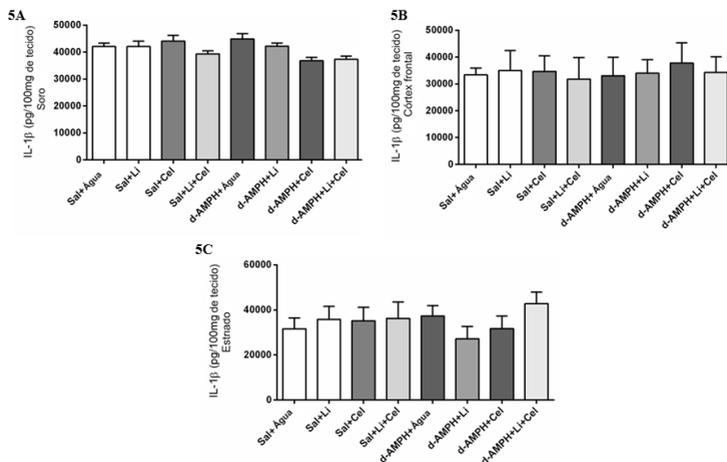
A figura 4 representa os níveis de TNF- $\alpha$  no soro (A), no córtex frontal (B) e no estriado (C) dos animais. A d-AMPH aumentou a concentração da citocina pró-inflamatória TNF $\alpha$  no soro, no córtex frontal e no estriado dos ratos. O tratamento isolado de Li e o combinado dos fármacos (Li + Cel) reverteram essa ação inflamatória da d-AMPH no soro e em todas as estruturas cerebrais avaliadas. O

tratamento isolado com Cel sozinho reverteu o aumento dos níveis de TNF $\alpha$  somente no estriado (**Figura 4C**).



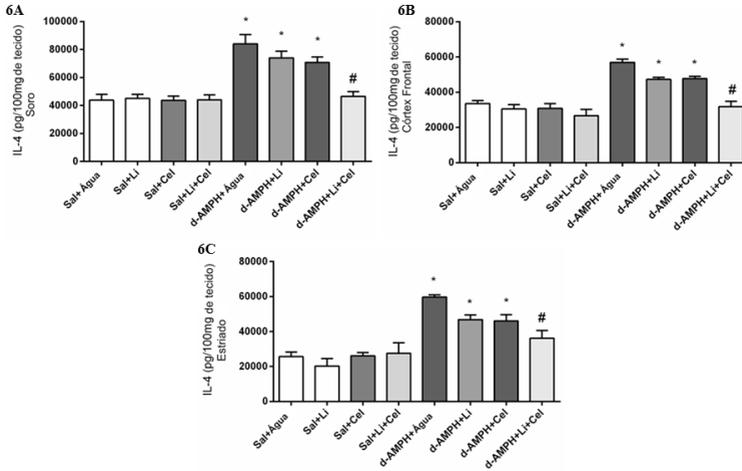
**Figura 4:** Concentração de TNF $\alpha$  no soro (4A), no córtex frontal (4B) e estriado (4C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

A figura 5 representa os níveis de IL-1 $\beta$  no soro (A), no córtex frontal (B) e no estriado (C) dos animais. Não houve alteração na concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  em nenhuma das estruturas e em nenhum dos grupos avaliados.



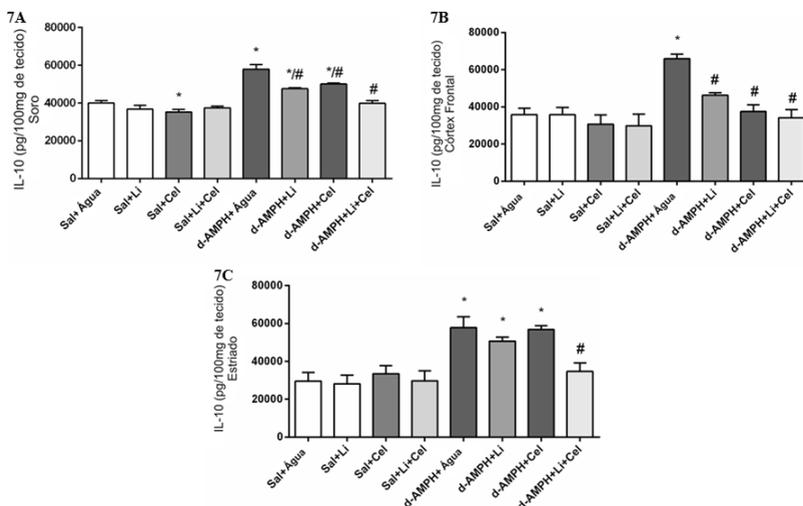
**Figura 5:** Concentração de IL-1 $\beta$  no soro (5A), no córtex frontal (5B) e estriado (5C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

A figura 6 representa os níveis de IL-4 no soro (A), no córtex frontal (B) e no estriado (C) dos animais. O aumento na concentração da IL-4 causado pela d-AMPH não foi alterado pelo tratamento isolado dos fármacos no soro, córtex frontal e estriado. Entretanto, a administração combinada do Li + Cel reverteu o efeito da d-AMPH em todas as amostras analisadas.



**Figura 6:** Concentração de IL-4 no soro (6A), no córtex frontal (6B) e estriado (6C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

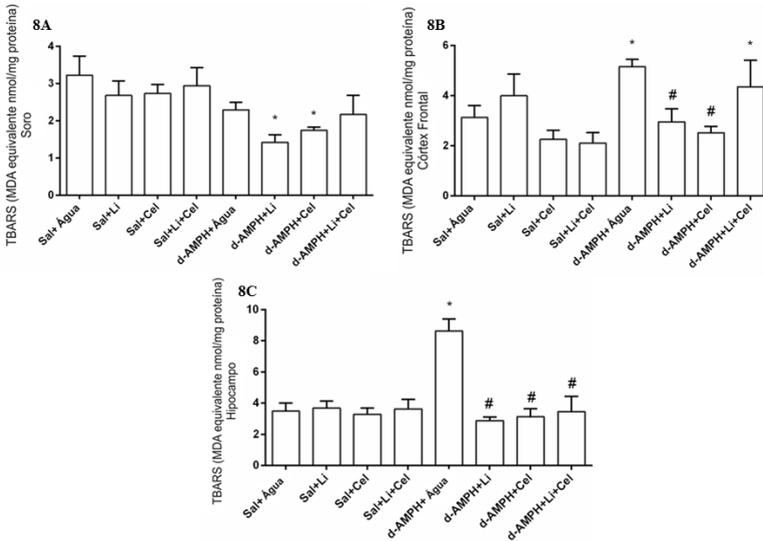
A figura 7 representa os níveis de IL-10 no soro (A), no córtex frontal (B) e no estriado (C) dos animais. A concentração sérica da citocina anti-inflamatória IL-10 foi reduzida nos animais do grupo Sal + Cel em relação ao grupo controle Sal + Água, como pode ser observado na **Figura 7A**. A d-AMPH elevou os níveis de IL-10 no soro, no córtex frontal e no estriado. Os tratamentos isolados de Li ou Cel atenuaram o efeito da d-AMPH sobre a IL-10 sérica (**Figura 7A**), embora não tenham alterado o aumento dos níveis de IL-10 induzido por d-AMPH no estriado (**Figura 7C**). Os tratamentos isolados com Li ou Cel reverteram o aumento da IL-10 induzido pela d-AMPH somente no córtex frontal (**Figura 7B**). O tratamento combinado dos medicamentos Li + Cel reverteu o aumento da IL-10 induzido pela d-AMPH em todas as amostras estudadas (**Figuras 7A, B e C**).



**Figura 7:** Concentração de IL-10 no soro (7A), no córtex frontal (7B) e estriado (7C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); #  $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

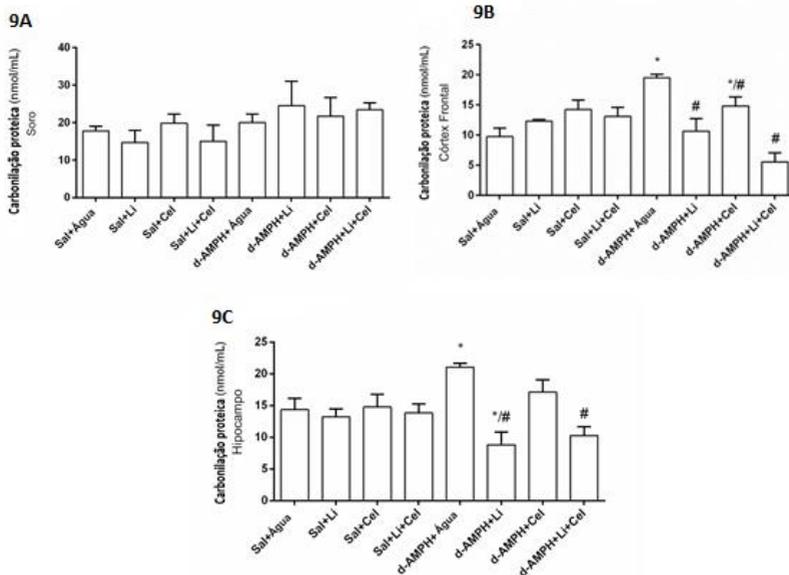
#### 4.3 ESTRESSE OXIDATIVO

A lipoperoxidação avaliada pela concentração de TBARS pode ser observada nas figuras 8A, B e C. A administração de d-AMPH aumentou os níveis de TBARS no córtex frontal (**Figura 8B**) e no hipocampo (**Figura 8C**), mas não no soro dos ratos (**Figura 8A**). A administração de d-AMPH nos animais que receberam água não alterou os níveis de TBARS no soro dos animais; entretanto, os níveis de TBARS no soro foram diminuídos nos grupos d-AMPH+Li e d-AMPH+Cel. A administração de d-AMPH aumentou os níveis de TBARS no córtex frontal e no hipocampo. A administração de Li ou Cel isolados reverteu o dano lipídico induzido pela d-AMPH



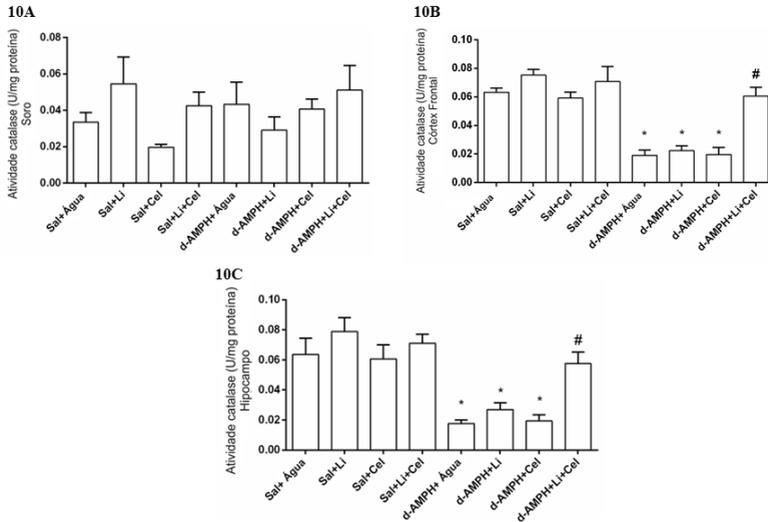
**Figura 8:** Concentração de TBARS no soro (8A), no córtex frontal (8B) e hipocampo (8C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

O dano oxidativo a proteína (Figuras 9A, 9B e 9C), avaliado através da quantificação dos grupamentos carbonila não apresentou diferença entre os grupos quando testada no soro (**Figura 9A**). A d-AMPH causou um aumento no dano oxidativo proteico no córtex frontal, o qual foi revertido com o tratamento isolado de Li e a associação de Li + Cel. Além disso, o tratamento isolado com Cel atenuou o dano oxidativo induzido pela d-AMPH no córtex frontal (**Figura 9B**). A d-AMPH também elevou o dano oxidativo proteico no hipocampo, e o tratamento combinado de Li + Cel reverteu o efeito da d-AMPH (**Figura 9C**). Ainda no hipocampo, pode ser observado uma redução na concentração de grupamentos carbonila no grupo d-AMPH+Li quando comparado com o grupo controle.



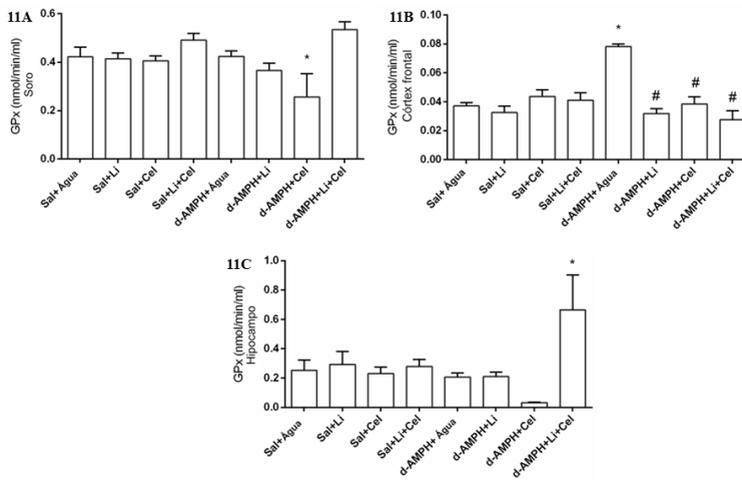
**Figura 9:** Concentração de Proteínas Carboniladas no soro (9A), no córtex frontal (9B) e hipocampo (9C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

A avaliação da atividade enzimática da CAT não apresentou diferença estatística entre os grupos quando testada no soro (**Figura 10A**). A d-AMPH causou uma redução na atividade da CAT no córtex frontal e o tratamento combinado de Li + Cel conseguiu reverter completamente essa alteração enzimática (**Figura 10B**), o mesmo também ocorreu no hipocampo (**Figura 10C**).



**Figura 10:** Atividade enzimática da Catalase no soro (10A), no córtex frontal (10B) e hipocampo (10C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) avaliada no soro mostrou-se menor no grupo d-AMPH+Cel quando comparada ao grupo controle (**Figura 11A**). A d-AMPH aumentou a atividade desta glutathiona no córtex frontal e o tratamento com Li ou Cel de forma isolada e a associação de Li + Cel reverteram este aumento (**Figura 11C**). No hipocampo houve um aumento da atividade da GPx no grupo d-AMPH+Li+Cel. (**Figura 11C**).



**Figura 11:** Atividade enzimática da Glutathiona Peroxidase no soro (11A), no córtex frontal (11B) e hipocampo (11C) em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH, tratados ou não com Li (24mg/kg) e/ou Cel (20mg/kg). Sal = salina (0,9% NaCl); d-AMPH = dextro-anfetamina; Li = lítio; Cel = celecoxib. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (Sal + água); # $p < 0,05$  em relação ao grupo d-AMPH + água de acordo com o teste ANOVA de três vias.

## 5 DISCUSSÃO

O modelo animal de mania induzido por d-AMPH é considerado um bom modelo experimental para estudar a fisiopatologia da mania bipolar (MachadoVieira et al., 2004; Valvassori et al., 2013). Estudos demonstraram que a exposição à AMPH por um longo período de tempo pode induzir alterações no sistema dopaminérgico, dano neuronal e alterações comportamentais, semelhantes às observadas em pacientes bipolares (Feier et al. 2012; 2013). Fármacos a base de AMPHs são capazes de induzir sintomas maníacos em voluntários saudáveis (Strakowski e Sax, 1998) bem como, causar uma virada maníaca em pacientes bipolares eutímicos (Joyce et al., 1995).

Modelos animais devem apresentar três validades: validade de face, validade de constructo e validade preditiva. A validade de face se refere a habilidade do modelo em mimetizar um sintoma de um determinado transtorno. A validade preditiva, por sua vez, está ligada a habilidade do modelo em mimetizar a fisiopatologia do transtorno. Finalmente, a validade de constructo se refere a habilidade do modelo em mimetizar o tratamento do determinado transtorno, ou seja, fármacos clássicos que tratam o determinado transtorno devem reverter e/ou prevenir os sintomas mimetizado no modelo (Nestler e Hyman,2010).

Neste estudo, pode-se observar que a administração de d-AMPH induziu hiperatividade em ratos, considerada um comportamento do tipo maníaco – demonstrando a validade de face do modelo. Em concordância a estes resultados, estudos anteriores realizados pelo Laboratório de Neurociências da UNESC têm demonstrado que a administração de d-AMPH leva a hiperatividade comportamental (Frey et al, 2006a; Valvassori et al, 2010; Valvassori et al., 2015). Além disso, prévios estudos têm demonstrado a validade preditiva do modelo, pois o tratamento com estabilizadores do humor, incluindo o Li, é capaz de reverter as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela d-AMPH (Frey et al., 2006a; Varela et al., 2013; Valvassori et al., 2015). Vale ressaltar que a administração terapêutica de Li, observada em estudos prévios, é de 47,5 mg/kg. No presente estudo, a administração de Li na dose de 24 mg/kg não reverteu o comportamento do tipo maníaco induzido por d-AMPH. Na verdade, esta dose foi escolhida a fim de avaliar o potencial terapêutico da associação de Li e Cel.

O tratamento com Cel isolado, não causou nenhum efeito sobre o comportamento do tipo maníaco induzido pela d-AMPH. Entretanto, a associação do Cel e Li na dose de 24 mg/kg foi capaz de reverter o

comportamento do tipo maníaco. Borre e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento por duas semanas com Cel reverteu a hiperatividade em animais bulbectomizados. O possível papel dos agentes anti-inflamatórios como adjuvantes no tratamento do TB tem sido o foco de alguns estudos recentes. Um ensaio clínico randomizado com placebo utilizando Cel mostrou que os pacientes bipolares que receberam este fármaco obtiveram uma melhora significativa nos sintomas depressivos após a primeira semana de tratamento, em comparação ao grupo controle (Nery et al., 2008). Alguns estudos demonstram que inibidores da COX-2, incluindo Cel, possuem efeitos sobre marcadores inflamatórios e sistemas de neurotransmissores envolvidos nos transtornos do humor (Casolini et al., 2002; Ross et al., 2002; Mirjany et al., 2002; Raison et al., 2006). Ross e colaboradores (2002) demonstraram que inibidores da COX modulam comportamentos dependentes de DA. Mais especificamente, estes pesquisadores demonstraram que a indometacina, um inibidor não seletivo da COX, reverteu a hiperatividade induzida por AMPH na dose de 1mg/kg. Portanto, sugere-se que, neste estudo, Cel pode estar modulando o sistema dopaminérgico e agindo de forma sinérgica com o Li para reverter o comportamento do tipo maníaco induzido pela d-AMPH.

Concomitantemente ao comportamento do tipo maníaco causado pela d-AMPH, ocorreu um aumento nos níveis das citocinas TNF $\alpha$ , IL-4 e IL-10 no soro, córtex frontal e estriado dos animais. Corroborando com estes dados, estudos anteriores demonstraram um aumento significativo nos níveis dessas citocinas, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ , no soro, córtex frontal e estriado de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-AMPH (Valvassori et al., 2015; 2017). Alguns estudos sugerem que a diminuição da síntese de DA ou um aumento na DA citosólica, pode diminuir e aumentar, respectivamente, a ativação da microglia no estriado de animais (La Voie e Hastings, 1999; Thomas et al., 2008), sugerindo essa possível relação entre a administração de AMPH e inflamação. Thomas e Kuhn (2005) demonstraram que o uso da AMPH causa um aumento na expressão da COX-2, um importante mediador inflamatório no estriado. Desta forma, pode-se sugerir que a DA pode estar relacionada com este possível processo inflamatório no cérebro de pacientes bipolares. É importante ressaltar que episódios de humor têm sido associados com estados pró-inflamatórios e os achados mais consistentes sugerem um aumento na concentração de TNF $\alpha$  e IL-6 associados a episódios de mania e depressão, em comparação com eutímicos e controles saudáveis (O'Brien et al., 2006; Hung et al., 2007; Ortiz-Dominguez et al., 2007). Como pode ser observado, o presente

estudo também apresentou um aumento de citocinas no soro dos animais, o que mimetiza a prática clínica, já que a maioria dos estudos clínicos mostram alterações nos níveis de citocinas no soro de pacientes bipolares (Rapaport et al., 1999; Bauer et al., 2005; Leboyer et al., 2012).

A IL-1 $\beta$  e o TNF $\alpha$  são conhecidos por serem potentes interleucinas pró-inflamatórias liberadas durante os estágios iniciais dos processos inflamatórios (Oshiro e Morris, 1997; Braddock e Quinn, 2004). Analisando os resultados do presente estudo, é possível observar que este modelo experimental levou a um aumento significativo dos níveis de TNF $\alpha$  no grupo d-AMPH+água. Porém, os níveis de IL-1 $\beta$  não diferiram do grupo controle, em nenhum tecido avaliado. Contrário as interleucinas citadas anteriormente, a IL-4 e a IL-10 são consideradas anti-inflamatórias (Curfs et al., 1997; Sommer e White, 2007). Interessantemente, no presente estudo, a administração de d-AMPH também aumentou os níveis dessas interleucinas, demonstrando a capacidade do modelo em mimetizar aspectos inflamatórios vistos em pacientes bipolares. Em estudos prévios, foi demonstrado que a AMPH aumenta níveis de TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-10, sem alterar os níveis de IL-1 $\beta$  (Valvassori et al., 2015, 2017). É bem descrito na literatura que as AMPHs causam um dano persistente aos neurônios dopaminérgicos (Frey et al., 2006b; Yamamoto et al., 2010; Feier et al., 2012), o que pode estar levando a ativação da micróglia e, conseqüentemente, a liberação das interleucinas (Yamamoto et al., 2010). Thomas e Kuhn (2005) encontraram que as AMPHs aumentam a expressão estriatal da COX-2, a qual é um mediador inflamatório. Portanto, no presente estudo a AMPH pode estar levando ao processo inflamatório através do dano ao sistema dopaminérgico e da ativação da COX-2.

De fato, no presente estudo, o tratamento com o inibidor de COX-2, Cel isoladamente, foi capaz de reverter total ou parcialmente as alterações nos níveis de TNF- $\alpha$  no estriado e IL-10 no soro e no córtex frontal dos animais submetidos a administração de d-AMPH. A variação dos efeitos do Cel dependente do tecido e da interleucina avaliados pode ser explicada, pelo menos em parte, pela dose do fármaco e pelo período de administração. Um estudo prévio demonstrou que a administração de Cel na dose de 5mg/kg durante 5 dias também não foi capaz de reverter o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no cérebro induzida pela administração de AMPHs (El-Sayed El-Sisi et al., 2016). Entretanto, o tratamento durante 30 dias com Cel foi capaz de reverter o aumento de TNF- $\alpha$  no hipocampo de camundongos submetidos a lesão hepática (Elnahas et al.,

2016). Portanto, os efeitos terapêuticos de Cel também são dependentes do dano induzido e da estrutura cerebral avaliada.

É importante notar que o Cel não reverteu o aumento de IL-4 induzida pela d-AMPH em todos os tecidos avaliados. Se consideradas IL-4 como atuando em sua via anti-inflamatória (Lee et al., 2002), pode-se sugerir que seus elevados níveis podem ter servido para modular o aumento de TNF $\alpha$ , uma vez que a IL-4, assim como o Cel, inibe COX-2 (Cui et al., 2006). Da mesma forma, Cel não reverteu o aumento nos níveis de IL-10 induzido pela d-AMPH no estriado. A IL-10 e IL-4 podem atuar em sinergismo na supressão da inflamação (van Roon et al., 2001); portanto, pode ser sugerido que o aumento dessas interleucinas pode ser em resposta ao aumento de TNF $\alpha$  induzido pela d-AMPH.

Em relação ao efeito de Li (24 mg/kg, metade da dose terapêutica) sobre as alterações de citocinas induzidas pela d-AMPH, pode ser observado que esse fármaco reverteu o aumento de TNF- $\alpha$  em todos os tecidos e IL-10 no córtex frontal e reduziu parcialmente os níveis de IL-10 no soro. Estudos prévios demonstraram que o tratamento com Li reduz a produção de TNF $\alpha$  (Arena et al., 1997; Yuskaitis e Jope, 2009; Himmerich et al., 2013; Wang et al., 2013), e aumenta a liberação de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-4 (Rapaport e Manji, 2001; Al-Azemi et al., 2010; Guloksuz et al., 2010) e a IL-10 (Maes et al., 1999; Martin et al., 2005; Ballanger et al., 2008; Zhang et al., 2009; Liu et al., 2011; Green e Nolan, 2012). Um estudo prévio, utilizando o modelo animal de mania dopaminérgico, demonstrou que o tratamento com Li, na dose de 47,5 mg/kg, foi capaz de reverter o aumento de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no cérebro e soro dos ratos (Valvassori et al., 2015). É descrito na literatura que Li inibe a expressão de COX-2 e síntese de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Além disso, Li também aumenta a síntese das interleucinas anti-inflamatórias IL-2 e IL-10 (Arena et al., 1997; Kucharz et al., 1998; Himmerich et al., 2013; Wang et al., 2013). Portanto, é evidente que o papel anti-inflamatório de Li está envolvido nos seus efeitos terapêuticos como estabilizador de humor.

O tratamento mais efetivo sobre as alterações nos níveis de citocinas induzidos pela d-AMPH, observado no presente estudo, foi a associação de Li e Cel. O tratamento adjunto de Li com Cel reverteu o aumento de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 induzido pela d-AMPH em todos os tecidos avaliados. Como descrito anteriormente, ambos, Li e Cel inibem a COX-2 e possuem efeitos modulatórios sobre as interleucinas (Arena et al., 1997; Kucharz et al., 1998; Wang et al., 2013; El-Sayed El-Sisi et al., 2016; Elnahas et al., 2016; Zweers et al., 2011). Portanto pode-se

sugerir que ao agir de forma conjunta os dois fármacos potencializam seus efeitos anti-inflamatórios.

Vale ressaltar, que muitos estudos têm sugerido que o estresse oxidativo exerce um papel importante na toxicidade induzida pelas AMPH (Frey et al., 2006a,b; Feier et al., 2012; 2013). O excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido pela AMPH pode levar a um aumento da liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo C e o DNA mitocondrial, os quais podem levar a um dano oxidativo ao DNA e proteínas e, conseqüentemente, a ativação inflamatória (Andreazza et al., 2008; Cechinel-Recco et al., 2012; Northrop et al., 2012). De fato, no presente estudo a d-AMPH aumentou dano oxidativo a lipídeos e a proteínas e diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes CAT e GPx no cérebro dos animais. Frey et al., (2006b), utilizando o modelo de mania dopaminérgico, também observaram aumento nos níveis de TBARS em amostras de hipocampo e córtex frontal. Nesse mesmo estudo, Frey e colaboradores (2006b), demonstraram que a d-AMPH induziu estresse oxidativo no cérebro de ratos. O estresse oxidativo pode ocorrer pelo excesso de produção de radicais livres e pela sua deficiência nos mecanismos antioxidantes (Barreiros e David, 2006). Portanto, pode ser sugerido que no presente estudo o aumento de dano oxidativo a proteínas e lipídeos induzido pela d-AMPH pode ter ocorrido pela diminuição das enzimas antioxidantes CAT e GPx.

No presente estudo, a administração de Cel foi capaz de reverter totalmente o aumento nos níveis de TBARS induzido por d-AMPH no cérebro. Além disso, esse fármaco reverteu parcialmente o aumento dos níveis de carbonil no córtex frontal induzido pela d-AMPH. Cel, quando utilizado isoladamente, já demonstrou a capacidade de provocar reversão no aumento dos níveis de danos lipídicos (Khanam et al., 2012; Osman 2016). Entretanto, esse foi o primeiro estudo que demonstrou os efeitos protetores do Cel sobre carbonilação de proteínas. Vários mecanismos podem explicar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do Cel, incluindo, diminuição da produção de citocinas, prostaglandinas, diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios, modulação da via de iNOS, diminuição da formação de radical hidroxila, prevenindo a excitotoxicidade e estresse oxidativo (Kronfol e Remick, 2000).

No presente estudo, Cel não reverteu a diminuição da atividade da CAT, porém, reverteu o aumento de GPx induzidos por d-AMPH. Jayashree e Prakash (2015) demonstraram haver uma relação dose-resposta em relação a utilização de Cel e atividade da CAT em modelo experimental de neuroinflamação. Estes pesquisadores, ao utilizarem 10 mg/kg, não observaram diferenças na atividade da CAT; já, ao

utilizarem a dose de 50 mg/kg, foi observado um aumento na atividade dessa enzima. Dessa forma, pode-se sugerir que, no presente estudo, a dose de 20mg/kg não foi o suficiente para alterar a atividade dessa enzima. Por outro lado, Kuhar e colegas, (2007) já haviam demonstrado que o tratamento com Cel associado a outros compostos/moléculas, como cisplatina e TNF $\alpha$ , reduziram os níveis de GPx. Juntos esses trabalhos demonstram que, dependendo do insulto, Cel pode modular a atividade das enzimas CAT e GPx.

O Li, no presente estudo, reverteu o aumento dos níveis e proteínas carboniladas e dano a lipídio no cérebro dos animais submetidos a administração de d-AMPH. Frey e colegas (2006b) demonstraram que a administração de Li preveniu a formação de TBARS, corroborando com os resultados do presente estudo. Outro estudo pré-clínico demonstrou que a administração de Li (na dose de 47,5 mg/kg) foi capaz de reverter o aumento de proteínas carboniladas induzido pela administração de m-AMPH (da-Rosa et al., 2012). Em um estudo anterior foi demonstrado que o Li protegeu os complexos da cadeia respiratória mitocondrial contra os danos induzidos pela d-AMPH (Valvassori et al., 2010). Tendo em vista que a produção de ROS acontece principalmente na mitocôndria (Callaly et al., 2015), pode-se sugerir que, no presente estudo, que Li reverte o dano oxidativo modulando a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. De fato, já é descrito na literatura que o Li apresenta um potencial neuroprotetor, que pode ter um papel importante nos seus efeitos terapêuticos (Dell'osso et al., 2016).

O Li foi capaz de reverter as alterações induzidas pela d-AMPH sobre a atividade da GPx, mas não da CAT. Macêdo e colegas (2013) demonstraram que o Li, na sua dose terapêutica (47,5 mg/kg) reverteu as alterações na atividade da GPx induzido por lisdexanfetamina. Prévios estudos do laboratório de neurociências demonstraram que Li, também na dose terapêutica, reverteu as alterações na atividade da CAT induzidas pela d-AMPH (Frey et al., 2006b). O comportamento destas enzimas, não obedeceram um padrão de atividade antioxidante linear em todas as amostras. Porém, em especial nas amostras de hipocampo, essa relação CAT-GPx foi bastante linear, reforçando a premissa de que podem existir respostas diferentes em diferentes locais do SNC.

A administração conjunta de Li com Cel apresentou resultados positivos no presente estudo, revertendo o aumento dos níveis de carbonil no cérebro e de TBARS no hipocampo dos animais submetidos a administração de d-AMPH. Diferentemente dos tratamentos isolados, a associação do Li e Cel reverteu as alterações nas enzimas

antioxidantes induzidas pela d-AMPH. Além dos efeitos antioxidantes de ambos os fármacos já descritos anteriormente (Andreazza et al., 2007; Bastos-Pereira et al., 2010), Phelan e colaboradores (2003) demonstraram que Li possui interação farmacológica com inibidores da COX-2, incluindo o Cel e o refecoxib. Esse mesmo estudo demonstrou que a concentração plasmática de Li aumentou em 99% com a administração conjunta de Cel com Li e aumentou em 448% com o tratamento adjunto com refecoxib. Sendo assim, o efeito sinérgico entre Li e Cel pode ser decorrente da potencialização dos efeitos do Li através do aumento de sua concentração plasmática induzida pelo Cel. Tendo em vista essa importante relação entre os dois fármacos, o presente estudo apresenta como limitação o fato de que os níveis plasmáticos de Li não foram dosados nos animais.

## **6 CONCLUSÃO**

Fundamentado nestes resultados, pode-se sugerir que no modelo animal de mania induzido por d-AMPH há elevação nos níveis de algumas interleucinas, bem como, da atividade de alguns biomarcadores para o estresse oxidativo, sugerindo o possível envolvimento destes na fisiopatologia do TB. Em relação ao tratamento utilizado, pode-se sugerir que a utilização combinada de Li + Cel, em sua maioria, mostrou resultados protetores quando avaliados sobre os níveis de interleucina e parâmetros de estresse oxidativo, sugerindo que a associação destes fármacos pode surgir como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do TB.

## REFÊRENCIAS

Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord.* 2012; 141:308–314.

Al-Azemi M, Omu FE, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Omu AE. Lithium protects against toxic effects of cadmium in the rat testes. *J. Assisted Reprod. Genet.* 2010; 27:469–476.

Amério A, Tonna M, Odone A, Stubbs B, Ghaemi SN. Heredity in comorbid bipolar disorder and obsessive-compulsive disorder patients. *Shanghai Archives of Psychiatry.* 2015; 27: 307-310.

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004; 8-25.

Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Ceresér KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Gonçalves CA. *J Psychiatr Res.* 2007; (41)6:523-529.

Andreazza AC, Kapczinski F, Kauer-Sant'Anna M, Walz JC, Bond DJ, Gonçalves CA, Young LT, Yatham LN. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2009; 34(4):263-71.

Arabzadeh S, Ameli N, Zeinoddini A, Rezaei F, Farokhnia M, Mohammadinejad P, Ghaleiha A, Akhondzadeh S. Celecoxib adjunctive therapy for acute bipolar mania: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Bipolar Disord.* 2015; (6):606-14.

Ballanger F, Tenaud I, Volteau C, Khammari A, Dréno B. Anti-inflammatory effects of lithium gluconate on keratinocytes: a possible explanation for efficiency in seborrhoeic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 2008; 300:215–223.

Baldessarini RJ, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Drugs and the treatment of Psychiatric Disorders: Depression and anxiety Disorders.*

in. Goodman & Gilman, the pharmacological basis of therapeutics, 11.ed. New York, USA: Mc Graw Hill, 2006, p.429-459.

Barbosa IG, Huguet RB, Neves FS, Bauer ME, Teixeira AL. Immunology of bipolar disorder. *J Bras Psiquiatr.* 2009; 58: 52-9.

Barbosa IG, Huguet RB, Mendonca VA, Sousa LP, Neves FS, Bauer ME, Teixeira AL. Increased plasma levels of soluble TNF receptor I in patients with bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2011; 261:139–143.

Barbosa IG, Rocha NP, Assis F, Vieira ÉL, Soares JC, Bauer ME, Teixeira AL. Monocyte and lymphocyte activation in bipolar disorder: a new piece in the puzzle of immune dysfunction in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 31:18(1).

Barreiros ALB, David JM. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006; 29(1):113-23.

Bastos-Pereira, AL, Lugarini D, Oliveira-Christoff A, Ávila TV, Teixeira S, Pires ARA, Muscará, MN, Cadena SMSC, Donatti L, Assis HCS, Acco A. Celecoxib prevents tumor growth in an animal model by a COX-2 independent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65:267-276.

Bauer MS, Altshuler L, Evans DR, Beresford T, Williford WO, Hauger R. Prevalence and distinct correlates of anxiety, substance, and combined comorbidity in a multi-site public sector sample with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2005; 85:1–15.

Belmaker RH, Bersudsky Y. Bipolar disorder: Mania and depression. *Discov Med.* 2004; 4(23):239-45.

Benes FM, Walsh J, Bhattacharyya S, Sheth A, Berretta S. DNA Fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2003; 60: 359-364.

Berk M, Kapczinski F, Andreatza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PV, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar

disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011; 35(3):804-17.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.* 1999(12); 2:123-130.

Borre Y, Lemstra S, Westphal KG, Morgan ME, Olivier B, Oosting RS. Celecoxib delays cognitive decline in an animal model of neurodegeneration. *Behav Brain Res*. 2012; 234(2):285-91.

Braddock M, Quinn A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; (4):330-9.

Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. Experiments in Personality. *Am J Psychiatry*. 1960; 1:31-71.

Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, Smolen J, Breedveld F, Day R, Dougados M, Ehrich EW, Gijon-Baños J, Kvien TK, Van Rijswijk MH, Warner T, Zeidler H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology*. 1999; 38:779-788.

Calabrese JR, Hirschfiel RM, Reed M. Impact of bipolar disorder on U.S. community sample. *J Clin Psychiatry*. 2003; 64(4):425-432.

Callaly E, Walder K, Morris G, Maes M, Debnath M, Berk M. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of bipolar disorder: effects of pharmacotherapy. *Mini Rev Med Chem*. 2015; 15(5):355-65.

Cannon Gw, Breedveld FC - Efficacy of cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am J Med*. 2001; 110:6-12.

Cappeliez P, Moore E. Effect of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*. 1990; (14):347-358.

Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. *Rev Bras Anestesiologia*. 1998; 48:137-158

Casolini P, Catalani A, Zuena AR, Angelucci L. Inhibition of COX-2 reduces the age-dependent increase of hippocampal inflammatory markers, corticosterone secretion, and behavioral impairments in the rat. *J Neurosci Res.* 2002; 68(3):337-43.

Cechinel-Recco K, Valvassori SS, Varela RB et al. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. *J Psychopharmacol* 2012; 26:1594–1604.

Chittiprol S, Venkatasubramanian G, Neelakantachar N, Babu SV, Reddy NA, Shetty KT, et al. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. *J Psychiatr Res.* 2010;44(5):310-3.

Chen CY1, Tzeng NS, Chen YC. Maintenance therapy of celecoxib for major depression with mimicking neuropsychological dysfunction. *Gen Hosp Psychiatry.* 2010; 32(6): 647.e7-9.

Chevon M, Berenshtein E, And Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 2000; 33:99–108.

Cui X, Yang SC, Sharma S, Heuze-Vourc'h N, Dubinett SM. IL-4 regulates COX-2 and PGE2 production in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343(4):995-1001.

Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997; (4):742-80.

da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Arent CO, Ferreira CL, Borges JL, Varela RB, Mariot E, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of wistar rats. *J Neural Transm.* 2012; 119:31–38.

da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Ornell F, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Varela RB, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of m-AMPH. *Psychiatry Res.* 2012; 198(3):521-6.

Dell'Osso L, Del Grande C, Gesi C, Carmassi C, Musetti L. A new look at an old drug: neuroprotective effects and therapeutic potentials of lithium salts. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016; 12:1687-703.

Dubois R, Abramson S, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J*. 1998; 12:1063-1088.

Einat H, Yuan P, Szabo, ST, Dogra, SMJI, HK. Protein kinase c inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2007; 55:123-131.

Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*. 1990; 6:469-490.

ELnahas EM, Zeid MS, Kawy HS, Hendawy N, Baher W. Celecoxib attenuates depressive-like behavior associated with immunological liver injury in C57BL/6 mice through TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ b dependent mechanisms. *Life Sci*. 2016; 163:23-37.

El-Sayed El-Sisi A, Sokkar SS, El-Sayed El-Sayad M, Sayed Ramadan E, Osman EY. Celecoxib and omega-3 fatty acids alone and in combination with risperidone affect the behavior and brain biochemistry in amphetamine-induced model of schizophrenia. *Biomed Pharmacother*. 2016; 82:425-31.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186:407-21.

Feier G, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Varela RB, Bavaresco D, Scaini G, Morais MO, Andersen ML, Streck EL, Quevedo J. Behavioral changes and brain energy metabolism dysfunction in rats treated with methamphetamine or dextroamphetamine. *Neurosci Lett*. 2012; 530:75-9.

Feier G, Valvassori SS, Varela RB, Resende WR, Bavaresco DV, Morais MO, Scaini G, Andersen ML, Streck EL, Quevedo J. Lithium and valproate modulate energy metabolism in an animal model of mania

induced by methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 103:89-96.

Felger JC, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman AA, Sanchez MM, Kalin NH, Ratti E, Nemeroff CB, Miller AH. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry.* 2007; 62(11):1324-33.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ramb.* 1997; 43(1):61-8.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci.* 2006a; 31(5):326-32.

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord.* 2006b; 8:275-80.

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet.* 2013; 381(9878):1672-82.

Geraldo JM, Costa JÁ, Priore SE, Alfenas RCG, Franceschini RCC. Utilização de biomarcadores inflamatórios para avaliação do estado Nutricional. *Rev Bras Nutr Clín.* 2009; 24(1):40-52.

Goncharova LB, Tarakanov AO. Molecular networks of brain and immunity. *Brain Res Rev.* 2007; 55:155-66.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53:110-8.

Green HF, Nolan YM. GSK-3 mediates the release of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 from cortical glia. *Neurochem Int.* 2012; 61(5):666-71.

Guloksuz S, Cetin EA, Cetin T, Deniz G, Oral ET, Nutt DJ. Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *J. Affective Disord.* 2010; 126:458–462.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Clarendon Press, 1989.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97(6):1634-58.

Himmerich H, Bartsch S, Hamer H, Mergl R, Schönherr J, Petersein C, Munzer A, Kirkby KC, Bauer K, Sack U. Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. *J Psychiatr Res* 2013; 47:1751–1759.

Huang TL, Hung YY, Lee CT, Chen RF. Serum protein levels of brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin-related kinase B in bipolar disorder: effects of mood stabilizers. *Neuropsychobiology.* 2012; 65(2):65-9.

Hung YJ, Hsieh CH, Chen YJ, Pei D, Kuo SW, Shen DC, Scheu WH, Chen YC. Insulin sensitivity, proinflammatory markers and adiponectin in young males with different subtypes of depressive disorder. *Clin Endocrinol.* 2007; 67:784-9.

Jayashree V, Prakash R. Protective effect of cox inhibitors on lipopolysaccharide induced sickness behaviour or neuroinflammation and oxidative stress on male wistar rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015; (7)6.

Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, Arent CO, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):162-8.

Joyce PR, Fergusson DM, Woollard G, Abbott RM, Horwood LJ, Upton J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in

rapid cycling bipolar affective disorder. *J Affect Disord.* 1995; 33:233-43.

Judd LL, Akiskal HS. The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. *J Affect Disord.* 2003; 73:123–31.

Kaizaki A, Tien L T, Pang Y, Cai Z, Tanaka S, Numazawa S, Bhatt AJ, Fan LW. Celecoxib reduces brain dopaminergic neuronal dysfunction, and improves sensorimotor behavioral performance in neonatal rats exposed to systemic lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation.* 2013; 10:45.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, Moreira JC, de Bittencourt Pasquali MA, Fries GR, Quevedo J, Gama CS, Post R. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011; 45(2):156-161.

Kapczinski F, Dias VV, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M. Brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: beyond trait and state: comment on 'Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disord.* 2009; 11(2):221-2.

Kapczinski F, Quevedo J e Colaboradores. Transtorno bipolar teoria e clínica. Porto Alegre, Ed Artmed, 392p, 2009.

Kapczinski F, Quevedo J e Colaboradores. Transtorno bipolar teoria e clínica. Porto Alegre, Ed Artmed, 198p, 2016.

Karplus TM, Saag KG. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cognitive function: have a beneficial or deleterious effect? *Drug Saf.* 1998; 19:427-433.

Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2005;62:593- 602.

Ketter TA, Sarma K, Silva R, Kroger H, Cucchiaro J, Loebel A. Lurasidone in the long-term treatment of patients with bipolar disorder: a 24-week open-label extension study. *Depress Anxiety*. 2016; 33(5):424-34.

Khanam R, Ahmed S, Akhtar M, Vohora D. Possible Modulating Effects of Celecoxib (COX II Inhibitor) on Antidepressant Action of Duloxetine (SNRI) in Stressed Mice. *Open Conf Proc J*. 2012; 3:35-41.

Kim GY, Lee JW, Ryu HC, Wei JD, Seong CM, Kim JH.. Proinflammatory cytokine IL-1beta stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J. Immunol*. 2010; 184(7):3946-54.

Kronfol ZI, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000; 157(5):683-94.

Kucharz EJ, Sierakowski S, Staite ND, Goodwin JS. Mechanism of lithium-induced augmentation of T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol*. 1998; 10:253–259.

Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilinc N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct*. 2002; 20(2):171-5.

Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(7):1677-81.

LaVoie MJ, Hastings TG. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci*. 1999; 19(4):1484-91

Leboyer M, Soreca I, Scott J, Frye M, Henry C, Tamouza R, Kupfer DJ. Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? *J Affect Disord*. 2012; 141(1):1-10.

Lee SW1, Hong YS, Chun CM, Moon JD, Kim SJ, Jung IC, Yoon YH, Lee BA, Moon SW, Choi SH, Moon CK. Anti-inflammatory effects of IL-4 and IL-10 on human polymorphonuclear leukocytes. *J Korean Med Sci.* 2002; 17(1):7-14.

Lipsky PE. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med.* 2000; 160:913-920.

Liu KJ, Lee YL, Yang YY, Shih NY, Ho CC, Wu YC, Huang TS, Huang MC, Liu HC, Shen WW, Leu SJ. Modulation of the development of human monocyte-derived dendritic cells by lithium chloride. *J. Cell. Physiol.* 2011; 226:424-433.

Lopez AD, Murray CC. The Global burden of disease, 1990-2020. *Nat. Med.* 1998; 4(11): 1241-1243.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. The pharmacological treatment of bipolar disorder: a systematic and critical review of the methodological aspects of modern clinical trials. *Nature.* 2015; 523(7560):337-41.

Macêdo DS, de Lucena DF, Queiroz AI, Cordeiro RC, Araújo MM, Sousa FC, Vasconcelos SM, Hyphantis TN, Quevedo J, McIntyre RS, Carvalho AF. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: relevance as an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 43:230-7.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28:209-24.

Maes M, Song C, Lin AH, Pioli R, Kenis G, Kubera M, Bosmans E. In vitro immunoregulatory effects of lithium in healthy volunteers. *Psychopharmacol.* 1999; 143:401-407.

Marnett LJ, Rowlinson WS, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J Biol Chem.* 1999; 274:22903-22906.

Martin Braddock & Anthony Quinn. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3:330-340.

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat. Immunol.* 2005; 6:777–784.

McIntyre RS, Soczynska JK, Beyer JL, Woldeyohannes HO, Law CW, Miranda A, Konarski JZ, Kennedy SH. Medical comorbidity in bipolar disorder: re-prioritizing unmet needs. *Curr Opin Psychiatry.* 2007; 20(4):406-16.

McNamara RK, Lotrich FE. Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target? *Expert Rev Neurother.* 2012; 12:1143-61.

Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RM, Petukhova M, et al. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch Gen Psychiatry.* 2007; 64:543–52.

Migliore, L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging.* 2005; 26: 587-595.

Miller AH, Haroon E, Raison CL, Felger JC. Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Dep Anx.* 2013; 30:297-306.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry.* 2009; 65(9):732-41.

Mirjany M, Ho L, Pasinetti GM. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 301(2):494-500.

Modabbernia, A, Taslimi, S, Brietzke, E, Ashrafi, M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74:15-25.

Muller N, Schwarz M. Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev*. 2010; 6:213-20.

Munkholm K, Vinberg M, Vedel Kessing L. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2013; 144:16–27.

Nery FG, Monkul ES, Hatch JP, Fonseca M, Zunta-Soares GB, Frey BN, Bowden CL, Soares JC. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol*. 2008; 23(2):87-94.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. neurosc*. 2010; 13:10.

Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. In *J Neuropsychopharmacol*. 2008; 6:851-876.

Niciu MJ, Ionescu DF, Mathews DC, Richards EM, Zarate JR. Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part II: bipolar disorder. *CNS Spectrums*. 2013; 11:1-10.

Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000; 80(1):315-60.

Northrop NA, Yamamoto BK. Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7:951–968.

Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002; 6:620-650.

O'Brien SM, Scully P, Scott LV, Dinan TG. Cytokine profiles in bipolar affective disorder: focus on acutely ill patients. *J Affect Dis.* 2006; 90:263-7.

Oliveira CM, Rioko Sakata K, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol* 2011; 2:255-265

Oliveira CMB, Sakata RK, TSA, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011; 6:255-265.

Ortiz-Dominguez A, Hernandez E, Berlanga C, Gutiérrez-Mora D, Moreno J, Heinze G, Pávon L. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord.* 2007; 9:596-602.

Oshiro Y, Morris DL. TNF-alpha release from human peripheral blood mononuclear cells to predict the proinflammatory activity of cytokines and growth factors. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1997; 37(1):55-9.

Osman EY. Effects of celecoxib or omega-3 fatty acids alone and in combination with risperidone on the behavior and brain biochemistry in amphetamine-induced model of schizophrenia. *Pharm. Bioprocess.* 2016; 4(6):113–125.

Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol.* 2004; 19(2):89-95.

Perazella MA, Tray K - Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: A pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 2001; 111:64-67.

Phelan KM, Mosholder AD, Lu S. Lithium interaction with the cyclooxygenase 2 inhibitors rofecoxib and celecoxib and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Clin Psychiatry.* 2003; 64(11):1328-34.

Post RM, Altshuler LL, Leverich GS, et al. Mood switch in bipolar depression: comparison of adjunctive venlafaxine, bupropion and sertraline. *Br J Psychiatry* 2006; 189: 124-131.

- Raison CL1, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 2006; 27(1):24-31.
- Rapaport MH, Guylai L, Whybrow P. Immune parameters in rapid cycling bipolar patients before and after lithium treatment. *J. Psychiatr. Res.* 1999; 33:335–340.
- Rapaport MH; Manji HK. The effects of lithium on ex vivo cytokine production. *Biol. Psychiatry.* 2001; 50:217–224.
- Ribeiro M, Laranjeira R, Cividanes G. Bipolar disorder and substance abuse. *Rev Psiq Clín.* 2005; 32:78-88.
- Rosa AR, Kapczinski F, Oliva R, Stein A, Barros HMT. Monitoring the compliance to lithium treatment, *Rev. Psiq. Clín.* 2006; 33(5):249-261.
- Ross BM, Brooks RJ, Lee M, Kalasinsky KS, Vorce SP, Seeman M, Fletcher PJ, Turenne SD. Cyclooxygenase inhibitor modulation of dopamine-related behaviours. *Eur J Pharmacol.* 2002; 450(2):141-51.
- Sachs GS, Printz DJ, Kahn DA, Carpenter D, Docherty JP. The Expert Consensus Guideline Series: Medication Treatment of Bipolar Disorder 2000. *Postgrad Med.* 2000; 1-104.
- Sanches RF, Assunção S, Hetem LAB. Impact of the comorbidity in the diagnosis and treatment of bipolar disorder. *Rev Psiquiatr Clínica.* 2005; 32:71-77.
- Santin A, Ceresér K, Rosa A. Compliance to Treatment in Bipolar Disorder, *Rev. Psiq. Clín. Supl.* 2005; 105-109.
- Shaltiel G, Guang C, Hussein K, Manji HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharm.* 2007; 7(1)22–26.
- Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr.* 2004; 17(2):227-36.
- Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses.* 1991; 35:298–306.

Sommer C, White F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010; 279-302.

Soontornniyomkij B, Everall IP, Chana G, Tsuang MT, Achim CL, Soontornniyomkij V. Tyrosine kinase B protein expression is reduced in the cerebellum of patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2011; 133(3):646-54.

Stefanescu C, Ciobica A. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *J Affect Disord.* 2012;143(1-3):34-8.

Strakowski SM, Sax KW. Progressive behavioral response to repeated d-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. *Biol Psychiatry.* 1998; 44:1171-7.

Thomas DM, Francescutti-Verbeem DM, Kuhn DM. Methamphetamine-induced neurotoxicity and microglial activation are not mediated by fractalkine receptor signaling. *J Neurochem.* 2008; 106(2):696-705.

Thomas DM, Kuhn DM. Cyclooxygenase-2 is an obligatory factor in methamphetamine-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313:870-6.

Thompson Ray M, Weickert CS, Wyatt E, Webster MJ. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 2011; 36(3):195-203.

Valvassori SS, Budni J, Varela R. B, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013; 35:121-31.

Valvassori SS, Rezin GT, Ferreira CL, Moretti M, Gonçalves CL, Cardoso MR, Streck EL, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *J Psychiatr Res.* 2010; 44(14):903-9.

Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, Bianchini G, Andersen ML, Quevedo J. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord.* 2015; 17(5):507-17.

Valvassori SS, Resende WR, Varela RB, Arent CO, Gava FF, Peterle BR, Dal-Pont GC, Carvalho AF, Andersen ML, Quevedo J. The Effects of Histone Deacetylase Inhibition on the Levels of Cerebral Cytokines in an Animal Model of Mania Induced by Dextroamphetamine. *Mol Neurobiol.* 2017 [Epub ahead of print].

van Roon, JAG, Lafeber FPJG, Bijlsma JWJ. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology.* 2001; 44.

Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Fraga DB, Resende WR, Arent CO, Zugno AI, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of mania induced by D-amphetamine. *Psychiatry Res.* 2013; 209(2):229-34.

Wang HM; Zhang T, Li Q, Huang JK, Chen RF, Sun XJ. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* 2013; 63:345–353.

Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci.* 2001; 21:5847-5853.

Yamamoto BK, Moszczynska A, Gudelsky GA. Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1187:101–121.

Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, O'Donovan C, Macqueen G, McIntyre RS, Sharma V, Ravindran A, Young LT, Milev R, Bond DJ, Frey BN, Goldstein BI, Lafer B,

Birmaher B, Ha K, Nolen WA, Berk M. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2013; 15:1-44.

Young JW, Goey AK, Minassian A, Perry W, Paulus MP, Geyer MA. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: mimicking quantitative assessment of manic behavior. *Psychopharmacol.* 2010; 208:443-54.

Yuskaitis CJ, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. *Cell. Signalling.* 2009;21, 264–273

Z. Kronfol, D.G. Remick. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am. J. Psychiatry.* 2000; 5:683–694.

Zhang P, Katz J, Michalek SM. Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) inhibition suppresses the inflammatory response to *Francisella* infection and protects against tularemia in mice. *Mol. Immunol.* 2009; 46:677–687.

Zweers MC, de Boer TN, van Roon J, Bijlsma JW, Lafeber FP, Mastbergen SC. Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(5):239.

**ANEXO**



**Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

**CERTIFICADO**

**Certificamos que o projeto intitulado “EFEITOS DO TRATAMENTO ADJUNTO DE LÍTIO COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO OU CELECOXIB SOBRE O COMPORTAMENTO, NÍVEIS DE CITOCINAS E DE NEUROTROFINAS E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA DOPAMINÉRGICO”, Protocolo nº 056/2015-2 sob a responsabilidade de Samira da Silva Valvassori, equipe: Roger B. Varela, Daniela V. Bavaresco, Paula T. Tonin, Gustavo C. Dal-Pont, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.**

Vigência do Projeto	15/02/2016 a 15/09/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogêneo Wistar
Nº. De animais	120g
Peso/Idade	250-300g/60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

**Protocol number: 056/2015-2**

**Principal Investigator:** Samira da Silva Valvassori

**Researchers:** Roger B. Varela, Daniela V. Bavaresco, Paula T. Tonin, Gustavo C. Dal-Pont, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda.

**Project title: “EFFECTS OF ADJUNCTIVE THERAPY OF LITHIUM WITH ACETYSALICYLIC OR CELECOXIB ON BEHAVIOR, CITOKYNES AND NEUROTROPHINS LEVELS AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN AN DOPAMINERGIC ANIMAL MODEL OF MANIA”.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 15 de dezembro de 2015.

  
**JAIRO JOSÉ ZOCHE**  
 Coordenador da CEUA