

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

**LUCIANO KURTZ JORNADA**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS  
INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE OUABAÍNA EM RATOS:  
IMPLICAÇÕES PARA UM MODELO ANIMAL DE MANIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

**CRCIÚMA  
DEZEMBRO DE 2012**

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

J82a Jornada, Luciano Kurtz.

Avaliações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intracerebroventricular de ouabaína em ratos : implicações para um modelo animal de mania / Luciano Kurtz Jornada ; orientador: João Luciano de Quevedo. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

81 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Ouabaína. 2. Estresse oxidativo. 3. Fator neurotrófico derivado do encéfalo. I. Título.

CDD. 21ª 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

---

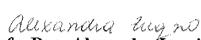
## PARECER

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 pelo candidato Luciano Kurtz Jornada sob o título “**Alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intracerebroventricular de ouabaína em ratos: implicações para um modelo animal de mania**” para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

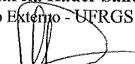
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2012.

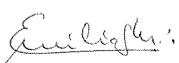
  
**Profa. Dra. Tatiana Barichello**  
Membro Relator - UNESC

  
**Profa. Dra. Alexandra Toppi Zugno**  
Membro Interno – UNESC

  
**Profa. Dra. Márcia Kauer Sant'Anna**  
Membro Externo - UFRGS

  
**Prof. Dr. Paulo Belmonte Abreu**  
Membro Externo - UFRGS

  
**Prof. Dr. João Luciano de Quevedo**  
Orientador

  
**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Coordenador do PPGCS



## AGRADECIMENTOS

Aos meus colaboradores do Jornada nesta jornada;

Professor Dr. João Luciano de Quevedo, pesquisador nacional cuja energia materializa-se num dos currículos mais impressionantes dentre os doutores da minha geração. Foi uma honra tê-lo mais uma vez como orientador e mais uma vez digo que “*me ajudou a fazer as pazes com a ciência*”, embora eu seguidamente ainda “*agrida a mesma*”.

Aos demais professores deste programa de pós-graduação da UNESC e colaboradores da UFRGS, pelas disposições imperturbáveis no aperfeiçoamento de nossos trabalhos. Qualidade só encontrada naqueles que tem profundo conhecimento da área e a teimosia de não rejeitar desafios.

À Samira, colaboradora mais assídua, que sacrificou momentos preciosos de seu lazer e estudos para o adestramento deste aprendiz. Seu mérito não cabe somente nas suas incansáveis horas de laboratório e grande conhecimento científico. Sua disponibilidade é incomum, qualidade com a qual esta tese foi muito beneficiada.

Aos demais membros do Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense, por terem me recebido (mais uma vez) de portas abertas no laboratório e proporcionado um ambiente de colaboração no mais virtuoso sentido da palavra. Estes supriram de diversas maneiras minhas limitações com o tempo, tanto as horas da agenda pessoal que é tumultuada, quanto o tempo dos anos de quem já passou dos 40 e ainda é aluno.



Aos pacientes (incluindo os “modelos de pacientes”) e alunos, os primeiros por voluntária ou involuntariamente me ensinarem muitas coisas e os últimos por me obrigarem a aprender para ensinar algumas coisas.

Não poderia deixar de citar também, meus mais fiéis amigos: Haldol, Ritalina, Zoloft, Dopamina, Clozapina, Benedita, Tampinha, Fedora, André, Maria... que estiveram sempre a minha disposição.

Aos meus pais, o Velho Jornadão (que nesta fase esteve presente somente na memória) e a *Véia* Ibéria (que do Rio Grande do Sul sempre pergunta pelos estudos e pela BR 101), mesmo distantes vocês me apontaram muitos caminhos.

Por último, mas também poderia ser primeiro, à Carolina, pelo carinho, broncas, dedicação, reclamações que dou trabalho, amor e momentos de raiva, que no conjunto dão sentido a isso tudo.



## RESUMO

O Transtorno do Humor Bipolar (THB) é uma doença crônica e debilitante que inclui episódios alternados de depressão e mania. Há um conjunto emergente de dados que sugerem que o THB está associado com alterações na neuroplasticidade e sobrevivência celular, incluindo danos ao DNA, mudanças no fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e mecanismos de estresse oxidativo. Vários estudos encontraram evidências diretas e indiretas para alterações no estado de humor relacionado com a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  no THB.

**Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo avaliar parâmetros comportamentais e neuroquímicos, em ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA), um inibidor específico da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . **Métodos:** os animais receberam uma única dose intracerebroventricular (ICV) de OUA ou fluido cerebrospinal artificial (aCSF), e foram avaliados em diferentes períodos até sete dias após a injeção. O comportamento avaliado foi a atividade motora, através do teste de campo aberto. Os dados neuroquímicos estudados foram os marcadores envolvidos no dano ao DNA, estresse oxidativo e níveis de BDNF, nas estruturas neuroanatômicas: hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Para investigar a validade preditiva do modelo, foram avaliados os efeitos do lítio (Li) e valproato (VPT) em níveis BDNF e marcadores de estresse oxidativo. No modelo de reversão, os animais receberam uma injeção única de ICV de OUA ou aCSF. Desde o dia após a injeção ICV, os ratos foram tratados durante 6 dias com injeções intraperitoneal (IP) de solução salina (SAL), Li ou VPT duas vezes por dia. No tratamento de manutenção (modelo de prevenção), os ratos receberam injeções IP de Li, VPT, ou SAL duas vezes ao dia por 12 dias. No sétimo dia de tratamento, os animais receberam uma injeção ICV de OUA ou aCSF. Finalmente, foram avaliados os efeitos da administração ICV de BDNF, sobre o dano oxidativo à lipídios e proteínas, no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania. **Resultados:** Os achados demonstraram que a OUA induziu hiperlocomoção, e esta resposta permaneceu até 7 dias após a sua administração. Li e VPT controlaram o comportamento hiperativo induzido pela OUA em ambos os modelos: reversão e manutenção. Observou-se aumento do índice de dano ao DNA no hipocampo induzido por OUA. Foi demonstrado uma redução



significativa nos níveis de BDNF no hipocampo e na amígdala. O uso de Li, mas não VPT, reverteu e impediu a redução da expressão de BDNF após administração de OUA, nessas mesmas estruturas. A OUA induziu a formação do estresse oxidativo nas estruturas córtex pré-frontal e hipocampo. A administração IP de Li e VPT reverteram e impediram o dano induzido por OUA, no entanto, este efeito varia dependendo da região do cérebro e regime de tratamento. O BDNF foi incapaz de reverter a hiperlocomoção induzida pela OUA. No entanto, o tratamento com BDNF protegeu o dano oxidativo induzido por OUA no cérebro de ratos. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o modelo atual apresenta adequada validade de face, construto e valor preditivo como um modelo animal de mania, apoiando a hipótese de disfunção da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase no THB.

**Palavras-chave:** mania, modelo animal, Na/K ATPase, ouabaína, fator neurotrófico-derivado do cérebro, estresse oxidativo.



## ABSTRACT

Bipolar Mood Disorder (BMD) is a chronic and debilitating illness which includes alternate episodes of depression and mania. There is an emerging body of data suggesting that bipolar disorder is associated with impairments in neuroplasticity and cell survival, including DNA damage, changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and Oxidative stress mechanisms. Several studies have found direct and indirect evidence for a mood-state related decrease in the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . **Objective:** In this study, we assessed the behavioral and neurochemical parameters in rats submitted to an animal model of mania induced by ouabain (OUA), a specific  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  inhibitor. **Methods:** Animals received a single intracerebroventricular (ICV) injection of OUA or artificial cerebrospinal fluid (aCSF), and in different periods at seven days after injection. The behavior was assessed motor activity through the Open Field Test. The data were studied neurochemical markers involved in DNA damage, oxidative stress and the level of BDNF in neuroanatomical structures: hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. To investigate predictive validity of the model, the effects of the lithium (Li) and valproate (VPT) were evaluated in BDNF levels and markers of oxidative stress. In the reversal model, animals received a single ICV injection of OUA or aCSF. From the day following the ICV injection, the rats were treated for 6 days with intraperitoneal (IP) injections of saline (SAL), Li or VPT twice a day. In the maintenance treatment (prevention model), the rats received IP injections of Li, VPT, or SAL twice a day for 12 days. In the 7th day of treatment the animals received a single ICV injection of either OUA or aCSF. Finally the effects of BDNF ICV administration on oxidative damage to lipid and protein in the brains of rats submitted to animal model of mania induced by OUA. **Results:** Our findings demonstrated that OUA induced hyperlocomotion in the open-field test, and this response remained up to 7 days following a single ICV injection. Li and VPT reversed OUA-related hyperactive behavior in both reversal and maintenance model. We observed increased hippocampal and peripheral index of early DNA damage. Showed a significant reduction in BDNF levels in amygdala and hippocampus. Li



treatment, but not VPT reversed and prevented the impairment in BDNF expression after OUA administration in these cerebral areas. OUA induced oxidative stress in prefrontal and hippocampus. Li and VPT treatment reversed and prevented the OUA induced damage, however this effect varies depending on the brain region and treatment regimen. The BDNF was unable to reverse the ouabain-induced hyperactivity. Nevertheless, BDNF treatment protects the OUA-induced damage in the brain of rats. **Conclusion:** Our results suggest that the present model fulfills adequate face, construct and predictive validity as an animal model of mania, supporting the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase hypothesis for BMD.

**Key Words:** mania, animal model, Na/K ATPase, ouabain, brain derived-neurotrophic factor, oxidative stress.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aCSF - Líquor artificial (Artificial cerebrospinal fluid)  
ANF - Anfetamina  
ANOVA - Análise de variância ( Analysis of variance)  
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro ( Brain deriver neurotrofic factor)  
CAT - Catalase  
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais  
DNA - Ácido Desoxiribonucleico (deoxyribonucleic acid)  
EAO - Espécies ativas de oxigênio  
EAN - Espécies ativas de nitrogênio  
ENC - Eritrócitos normocromáticos  
GLU - Glutamato  
ICV - Intracerebroventricular  
IM - Intramuscular  
IP - Intraperitoneal  
LCR - Líquido cefalorraquidiano ou líquido  
Li - Sais de lítio (carbonato ou cloreto de lítio)  
MN - Micronúcleo  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase - Sódio-potássio trifosfatase de adenosina  
NGF - Fator de crescimento neural ( Neural growth factor)  
NO - Óxido nítrico  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Peroxinitrito  
NT-3 - Neurotrofina-3  
NT-4 - Neurotrofina-4  
OUA - Ouabaína  
PCES - Eritrócitos policromáticos ( polychromatic erythrocytes)  
PKC - Proteína quinase C  
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro (Messenger ribonucleic acid)  
SAL - Solução Salina  
SBNeC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento  
SNC - Sistema nervoso central  
SNP - Sistema nervoso periférico  
SOD - Superóxido dismutase  
SPSS - Statistical Package for Social Science  
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive species)  
THB - Transtorno de Humor Bipolar



TrK - Tirosina quinase  
VPT - Valproato de sódio



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
2. DESENVOLVIMENTO .....	24
2.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	24
2.1.1. Neurobiologia do THB .....	24
2.1.2. Modelos animais de THB.....	29
2.1.3 Modelo de mania induzida por OUA.....	30
2.1.4. Justificativa.....	31
2.2 OBJETIVOS.....	32
2.2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2.2. Objetivos Específicos.....	32
2.3 MÉTODOS .....	34
2.3.1. Desenho experimental.....	34
2.3.2. Animais experimentais.....	34
2.3.3. Procedimento cirúrgico.....	34
2.3.4 Procedimentos experimentais.....	34
2.3.5 Avaliações comportamentais .....	36
2.3.6 Avaliações bioquímicas .....	37
2.3.7 Análise estatística .....	39
2.3.8 Aspectos éticos .....	40
2.4 RESULTADOS.....	41
2.4.1 Resultados do Artigo 1: atividade motora e dano ao DNA (Jornada <i>et al.</i> , 2010a).....	41
2.4.2. Resultados do Artigo 2: atividade motora e níveis de BDNF (Jornada <i>et al.</i> , 2012 – no prelo).....	43
2.4.3 Resultados do Artigo 3: reversão e prevenção da redução do BDNF com Li e VPT .....	46
2.4.4. Resultados do Artigo 4: estresse oxidativo (Jornada <i>et al.</i> , 2011) .....	50
2.4.5. Resultados do artigo 5: administração de BDNF e estresse oxidativo.....	62
2.5 DISCUSSÃO.....	65
2.5.1 Atividade motora.....	65
2.5.2 Análises bioquímicas .....	66
2.5.3 Comportamento e neuroquímica .....	71
2.5.4 Limitações .....	72
2.5.5 Outros mecanismos envolvidos .....	72
3. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76



## 1. INTRODUÇÃO

Na sociedade atual, um indivíduo de aparência jovial, elevado nível de sociabilidade, auto-confiante, muito motivado, bastante ativo, possuidor de inteligência acima da média, sem medo de enfrentar desafios ou riscos, pensamento rápido... tem tudo para ser muito bem sucedido? Na maioria das vezes sim, porém caso estejamos nos referindo a uma pessoa com Transtorno de Humor Bipolar (THB) devemos esperar uma série de problemas.

O THB é uma enfermidade crônica, severa e associada à elevada morbidade e mortalidade sendo caracterizado por episódios de mania ou hipomania e depressão, intercalados por períodos de eutímia (Rush, 2003; Kupfer, 2005). Mais de dois milhões de adultos americanos, ou aproximadamente 1% da população, são bipolares (Spearing, 2001; Hirschfeld *et al.*, 2003). O THB se desenvolve tipicamente em jovens, mas em alguns casos tem seus primeiros sintomas durante a infância ou em idades mais avançadas, além de muitas pessoas sofrerem por anos sem serem corretamente diagnosticadas e tratadas (Baldessarini, 1999; Judd *et al.*, 2002). O termo bipolar expressa dois pólos de humor ou de estados afetivos que se alternam: a depressão e seu oposto, a hipomania ou a mania (Calabrese *et al.*, 2003). A mania, dependendo da gravidade, tem manifestações como euforia, energia exagerada, grandiosidade, aceleração e uma sensação de prazer intenso ou um estado altamente irritável e agressivo (Calabrese *et al.*, 2003). Mania ou hipomania são tratadas com sais de lítio (Li), anticonvulsivantes e antipsicóticos, em monoterapia ou em associações, algumas vezes ainda suplementados com um potente sedativo em curto prazo. O Li e certos anticonvulsivantes, como o valproato de sódio (VPT), tem propriedades de estabilizadores do humor, e são usados para prevenção em longo prazo de recorrências dos episódios (Baldessarini, 2006).

A alta prevalência de THB é particularmente digna de nota por causa do significativo prejuízo associado a esta condição, não somente aos pacientes, mas também aos parentes e cuidadores (Ten *et al.*, 2002; Calabrese *et al.*, 2003). O THB está sendo visto não somente como uma doença com manifestações puramente psicológicas, mas como uma doença sistêmica associada frequentemente com problemas cardiovasculares, diabetes, obesidade e doenças na tireóide (Kupfer, 2005).

Apesar destes fatos, pouco se sabe sobre a neurobiologia do THB. A fisiopatologia deste transtorno não está completamente compreendida, entretanto diversos marcadores neuroquímicos têm sido propostos. Recentes estudos tem consistentemente demonstrado um aumento de estresse oxidativo e alterações em enzimas antioxidantes em pacientes com THB (Kuloglu *et al.*, 2002; Ozcan *et al.*, 2004). Algumas teorias atuais relacionam o possível envolvimento de neurotrofinas, particularmente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF da sigla em inglês) e fator de crescimento neural (NGF da sigla em inglês) com a fisiopatologia do THB (Shaltiel *et al.*, 2007). Outras pesquisas também tem apontado aumento intracelular de sódio e cálcio, bem como possíveis implicações na gênese do THB em disfunção na sódio-potássio trifosfatase de adenosina ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) (Hamid *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). Entre as estruturas cerebrais, estudos de neuroimagem encontraram dados consistentes de hipofunção frontal (Houglund *et al.*, 2008), avaliações de memória afetiva demonstraram déficits em amígdala (Kauer-Sant'Anna *et al.*, 2008), bem como disfunções em hipocampo estão classicamente associadas a transtornos de humor (Machado-Vieira *et al.*, 2004a).

Tendo em vista o exposto acima, a presente tese buscou estudar, em ratos, alterações em atividade motora e neuroquímicas. Foi usado a hiperlocomoção como comportamento semelhante à mania, quanto as alterações neuroquímicas foram avaliadas marcadores de estresse oxidativo, dano ao ácido desoxiribonucléico (DNA) e BDNF. Empregou-se a administração de ouabaína (OUA), que é uma substância inibidora da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, para produzir um modelo animal de mania.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 2.1.1. Neurobiologia do THB

##### 2.1.1.1. Estresse oxidativo e THB

Os radicais livres, de acordo com a definição clássica de Halliwell e Gutteridge (1999), são espécies químicas capazes de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo rompimento de uma ligação covalente, caso cada um dos átomos envolvidos fique com um elétron. Essa situação energeticamente instável é o que confere alta reatividade a essas espécies.

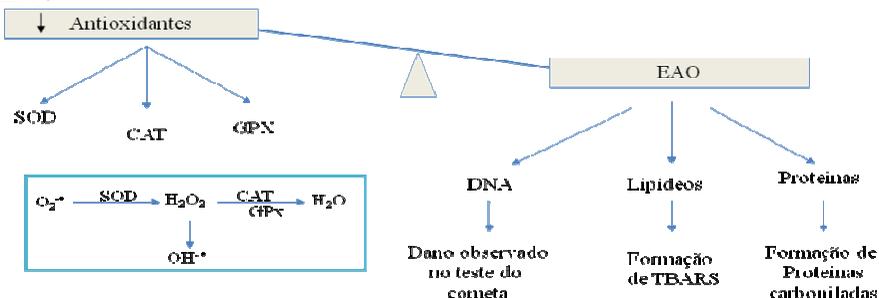
Espécies ativas de oxigênio (EAO) é um termo frequentemente utilizado para incluir radicais de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$  e  $OH\cdot$ ), mas também derivados não radicais de  $O_2$  ( $H_2O_2$ ,  $O_3$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além dessas, existem ainda espécies ativas de nitrogênio (EAN), que tem como principais representantes o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) e o peroxinitrito ( $NO_3^{\cdot-}$ ) (Sakar e Bhaduri, 2001; Bowler e Crapo, 2002).

Em condições normais (organismos saudáveis), a produção de EAO é em maior parte balanceada pelos sistemas de defesas antioxidantes no organismo. Quando um desequilíbrio ocorre entre a produção de oxidantes e a defesas antioxidantes, cria-se um estado que se denomina estresse oxidativo (Cross *et al.*, 2002). Assim, o termo estresse oxidativo é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas é maior que a capacidade de produção das defesas antioxidantes disponíveis. Podendo resultar tanto em uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a uma combinação de qualquer um desses fatores (Halliwell, 2001). Portanto, o estresse oxidativo se refere à situação onde há um desequilíbrio na

produção das EAO e as defesas antioxidantes. Podendo causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo ácido desoxiribonucleico (DNA), proteínas e lipídeos (peroxidação de lipídeos). O estresse oxidativo severo produz danos irreversíveis que leva a morte celular, podendo ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As EAO têm um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças neuropsiquiátricas (Calabrese *et al.*, 2001; Bem-Shachar, 2002). O cérebro é em particular vulnerável a produção de EAO, pois metaboliza 20% do oxigênio total do corpo e por isso possui uma capacidade antioxidante limite (Floyd, 1999). Em situações onde a geração de radicais livres excede a capacidade de defesa antioxidante, o estresse oxidativo pode levar a degradação da membrana, disfunção celular e apoptose. Existem estratégias celulares de defesa contra as EAO que incluem defesas enzimáticas e não enzimáticas. Estas são encarregadas de manter baixas as concentrações de EAO (Llesuy, 2002). Para evitar a formação, assim como reparar os danos oxidativos em tecidos e macromoléculas, todos os organismos possuem um complexo sistema de defesa antioxidante (Molina *et al.*, 2003). Algumas destas defesas enzimáticas são a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (Ames *et al.*, 1993). A figura 2.1.1.1 representa este desequilíbrio entre defesas e EAO e conseqüente dano ao DNA, a lipídeos e proteínas, com os respectivos indicadores deste dano, empregados nesta tese explicados adiante.

Figura 2.1.1.1- Modelo de desequilíbrio entre defesas antioxidantes e EAO



Adaptado de *Halliwel & Gutteridge, 1999*

Isso pode ser relevante para a fisiopatologia de THB, pois estudos de espectroscopia de ressonância magnética *in vivo* têm demonstrado mudanças nos compostos cerebrais relacionados à fosforilação oxidativa e produção de energia (Stork e Renshaw, 2005). Em estudos realizados no mesmo laboratório da presente tese, verificaram que o estresse oxidativo induzido pela anfetamina também é revertido e prevenido pelos estabilizadores do humor lítio (Li) e valproato de sódio (VPT) (Frey *et al.*, 2006b) sustentando evidências de que o estresse oxidativo pode estar ligado à fisiopatologia de THB (Kuloglu *et al.*, 2002; Ozcan *et al.*, 2004) Além disso, tem sido levantada a hipótese de que o THB está associado com disfunções na mitocôndria (Kato e Kato, 2000) que pode levar a uma queda nas trocas de energia e degeneração celular (Calabrese *et al.*, 2001).

#### 2.1.1.2. Dano em DNA, disfunção mitocondrial e THB

A exposição crônica a EAO, que são formados em sua maioria na mitocôndria durante o metabolismo celular normal, é um dos principais fatores implicados no processo de envelhecimento e neurodegeneração (Ames *et al.*, 1993). As mitocôndrias de células neurais e gliais são particularmente importantes para as funções cerebrais, pois fornecem a energia requerida para a atividade da sinapse e também estão ligadas as funções metabólicas (Ly e Verstreken, 2006; Ledox *et al.*, 2007). As EAO são importantes agentes genotóxicos, que geram danos no DNA, vários desses danos são reparados pela via de reparação geral por excisão (Wilson *et al.*, 2007; Brooks, 2007). Entretanto, acúmulo de dano oxidativo no DNA mitocondrial e no genoma nuclear de células neurais podem ter um papel importante no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas (Bussuttil *et al.*, 2007; Niedemhofer *et al.*, 2006).

O DNA é uma molécula orgânica vulnerável ao ataque por outros agentes químicos, que pode resultar em alterações na sua propriedade de codificador. O dano na estrutura do DNA pode ocorrer através de dois mecanismos principais: 1) dano de origem interna, que ocorre espontaneamente pelo metabolismo celular e 2) dano de origem externa, que ocorre através de um agente químico ou por radiação (Rao,

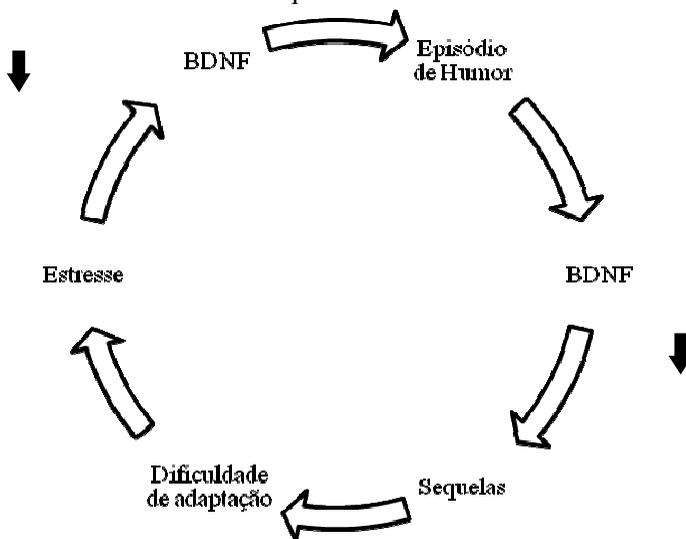
2007). O aumento do conhecimento sobre transtornos psiquiátricos, e a impressionante susceptibilidade do dano oxidativo ao DNA, resultou em uma considerável atenção na via de reparo e estabilidade genômica cerebral (Rao, 2007). O teste cometa é uma técnica rápida para verificar quantitativamente quebras simples e duplas no DNA (Tice *et al.*, 2000). A técnica do teste cometa tem sido largamente usada para estudos de biomonitoramento em humanos, como um biomarcador de genotoxicidade, o teste pode ainda identificar grupos de indivíduos com potencial para desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Migliore *et al.*, 2005). O dano ao DNA pode ativar várias vias de sinalização intracelular como a fosforilação de p53 em serina e resíduos de treonina que leva a apoptose celular (Evan e Littlewood, 1998; Culmsee e Mattson, 2005). Em um estudo *post-mortem*, onde foi avaliada a fragmentação do DNA em pacientes bipolares, não foi encontrada quebra em DNA no córtex cerebral (Benes *et al.*, 2003). Em contrapartida, em um estudo onde foi avaliado dano em DNA em pacientes bipolares usando o teste cometa, mostrou-se um aumento considerável na frequência de dano no DNA sanguíneo (Andreazza *et al.*, 2007a). O mesmo foi demonstrado no modelo animal de mania induzido por anfetamina (dados submetidos à publicação).

### 2.1.1.3. Neurotrofinas e THB

As neurotrofinas são fatores intermediários que regulam a diferenciação e sobrevivência de neurônios, modulam a plasticidade e a transmissão sináptica, bem como podem exercer atividade anti-apoptótica. Estes fatores podem ser secretados constitutivamente em um curto intervalo ou ainda dependendo da atividade neuronal. As neurotrofinas ligam-se e ativam uma família específica de receptor de tirosina quinase (TrK) promovendo uma regulação complexa no sistema nervoso central (SNC). Devido a esses fatores, essenciais para funcionamento e sobrevivência neuronal, supõe-se que a viabilidade neuronal pode ser afetada pela redução persistente dessas neurotrofinas no SNC (Du *et al.*, 2003). O peptídeo NGF foi o primeiro fator trófico a ser identificado. O NGF é produzido pelos alvos dos axônios na divisão sináptica do sistema nervoso (Caggiula, 2005). Esse peptídeo, produzido e liberado pelos tecidos-alvos, é absorvidos pelos axônios sinápticos e transportado retrogradamente, promovendo a sobrevivência neuronal; entretanto, mesmo com a liberação de NGF pelos tecidos-alvos pode

ocorrer morte celular se o transporte axoplasmático for interrompido (Schramm, 2005). Kapczinski *et al.* (2008) propõem que o BDNF desempenha um papel central na transdução de estresse psicossocial e episódios recorrentes na neurobiologia do THB, conforme representado em figura 2.1.1.3.

Figura 2.1.1.3 – Modelo que integra o ciclo de episódios de humor redução de BDNF e estressores neuroquímicos e sociais.



Adaptado de Kapczinski *et al.*, 2008

As expansões neuronais em desenvolvimento projetam-se em áreas com concentrações elevadas de NGF, que se liga a receptores específicos para sofrer passagem endocitótica, uma vez no citoplasma, o NGF é carregado por transporte axonal retrógrado rápido para o soma, onde promove ações tróficas (Caggiula, 2005). O NGF é um dos membros da família das proteínas tróficas coletivamente chamadas de neurotrofinas. Os membros dessa família incluem a neurotrofina-3 (NT-3), a neurotrofina-4 (NT-4) e o BDNF. São requeridos para a diferenciação e a sobrevivência de sub-populações neuronais específicas, tanto no Sistema Nervoso Periférico (SNP), como no SNC (Kalb, 2005). O BDNF apóia a expansão dos axônios dos neurônios da

dopamina e da acetilcolina. Níveis mais altos de atividade neuronal estimulam a liberação de BDNF. Em alguns estudos foram demonstrados que os ratos que não podem produzir o BDNF morrem em poucas semanas e os animais que estão vivendo em ambientes de alto estresse produzem níveis mais baixos desse fator (Frey *et al.*, 2006a,c; Obata e Noguchi, 2006).

Recentes trabalhos demonstram que uma diminuição de plasticidade e resiliência celulares podem estar envolvidas no THB, e que antidepressivos e estabilizadores do humor exercem efeitos em vias de sinalização que regulam a plasticidade celular (Coyle e Duman, 2003; Payne *et al.*, 2003). Vários estudos demonstram uma redução no volume de algumas regiões do cérebro acompanhada pela atrofia e perda celular em pacientes com THB. Assim como estudos estruturais de imagem que demonstram um volume de massa cinzenta reduzida no córtex pré-frontal, estriado e ventrículo em transtornos do humor (Drevets, 2001; Goodwin e Jamison, 2003; Manji e Duman, 2001). Além disso, estudos neuropatológicos *post-mortem* têm mostrado redução no volume cortical e no tamanho das células gliais no córtex pré-frontal e na amígdala (Drevets, 2001; Manji e Duman, 2001; Goodwin e Jamison, 2003). Permanece ainda a dúvida se esses danos promovem anormalidades em episódios do humor ou se essas sequelas são produzidas por episódios recorrentes do humor (Shaltiel *et al.*, 2007). Em estudos recentes do nosso laboratório foi demonstrado um aumento de BDNF (Frey *et al.*, 2006a), de NGF (Frey *et al.*, 2006c) e de NT-3 (Walz *et al.*, 2008) em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de mania induzido pela administração de anfetamina (ANF), que foram parcialmente revertidos quando tratados com Li e VPT. Estes resultados reforçam a ideia de que os efeitos terapêuticos dos estabilizadores do humor podem estar associados com o aumento de fatores neurotróficos, implicando a possível participação dos mesmos no THB.

### **2.1.2. Modelos animais de THB**

Estudos anteriores descrevem que para ser válido, um modelo animal em transtornos psiquiátricos deve demonstrar três características principais: mimetizar os sintomas da doença determinada (validade de face); habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença (validade de construto) e, finalmente, os

agentes terapêuticos usados no tratamento devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva) (Ellenbroek e Cools, 1990). O desenvolvimento de modelos animais tem sido uma ferramenta importante para o estudo dos sistemas intracelulares envolvidos no THB (Manji e Chen, 2002; Einat *et al.*, 2003). O marco clínico para o diagnóstico de THB é a presença de sintomas maníacos (Belmaker, 2004); assim, um modelo animal adequado de THB deve assemelhar-se a algumas características de um episódio maníaco, tais como euforia, irritabilidade, agressividade, hiperatividade, insônia, ou atividade sexual aumentada (Ellenbroek e Cools., 1990). Estudos prévios deste laboratório caracterizaram bem o modelo animal de mania bipolar induzido pela administração da anfetamina, onde os estabilizadores do humor reverteram e preveniram a hiperatividade induzida por esse psicoestimulante (Frey *et al.*, 2006a). Sabe-se que os estimulantes induzem sintomas maníacos em pacientes com THB (Joyce *et al.*, 1995) bem como em voluntários saudáveis (Anand *et al.*, 2000). Entretanto, o desenvolvimento de novos modelos animais é importante para investigar outros sistemas intracelulares que podem estar envolvidos na fisiopatologia do THB e que porventura não sejam investigados nos modelos usando anfetamina.

### **2.1.3 Modelo de mania induzida por OUA**

A caracterização da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, levou vários pesquisadores a examinarem esta atividade em pacientes com transtornos de humor, e anormalidades no eletrólito foram encontradas (Huff *et al.*, 2010). A função da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase é manter o gradiente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática do neurônio (Matsumoto *et al.*, 2006). Christo e El-Mallakh reportaram direta e indiretamente que a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase está envolvida na neurobiologia do THB (1993). Os estudos propõem que os sintomas maníacos são uma manifestação da hiperexcitabilidade neural que resulta de uma diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (El-Mallakh, 1983; El-Mallakh, 1993). Portanto, é de extremo interesse para o desenvolvimento de novos modelos animais de mania o descobrimento/desenvolvimento de inibidores específicos dessa enzima.

A OUA é um composto que promove alterações na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Lees *et al.*, 1995; El-Mallakh *et al.*, 2006), cuja administração intracerebroventricular (ICV) em ratos é considerada um bom modelo animal de mania (Li *et al.*, 1997; Hennion *et al.*, 2002; El-Mallakh *et al.*,

2003). A OUA é um potente inibidor específico da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Lees *et al.*, 1995; El-Mallakh *et al.*, 2006). A administração ICV de OUA induz hiperlocomoção nos ratos, sendo completamente prevenida pela administração de Li (Decker *et al.*, 2000; El-Mallakh *et al.*, 2006) e carbamazepina (Decker *et al.*, 2000). A administração de OUA ICV possui a grande vantagem de induzir hiperlocomoção que persiste por vários dias, diferentemente da administração de anfetamina intraperitoneal que perde seu efeito rapidamente. Desta forma, Machado-Vieira e colaboradores (2004b) mostraram que a administração ICV de OUA aumenta os níveis séricos de S100B, que é uma proteína que se liga ao cálcio, produzida e liberada em maior quantidade por astrócitos. Em baixo nível extracelular a S100B exerce efeitos tróficos em células neuronais; entretanto, estudos clínicos mostram que em grandes quantidades essa proteína pode representar um marcador de dano ao SNC em transtornos agudos e crônicos, como doença de Alzheimer, depressão, esquizofrenia e mania. Além disso, observou-se que pacientes maníacos e depressivos apresentam alterações na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Essas informações suportam a hipótese de que a administração ICV de OUA em ratos pode ser considerada um promissor modelo animal de mania.

#### **2.1.4. Justificativa**

Assim como a totalidade dos transtornos psiquiátricos, no THB não se tem a compreensão completa de sua fisiopatologia. Apesar da grande quantidade e diversidade de estudos avaliando a biologia da doença, ainda pouco se sabe sobre a real associação entre os achados neurobiológicos e as alterações observadas nos pacientes. Os fármacos empregados atualmente no tratamento do THB (Li, anticonvulsivantes e antipsicóticos) são efetivos apenas em 50 a 70% dos pacientes ainda, apresentam diversos efeitos adversos (Houglund *et al.*, 2008). A prática clínica no atendimento aos pacientes bipolares permite identificar estas situações inquietantes, relativas à falta de conhecimentos sólidos sobre fisiopatologia do transtorno e a refratariedade a tratamento. Pesquisas em modelos animais de mania a cerca de alterações neuroquímicas e comportamentais são importantes não só para compreender a fisiopatologia de THB, como também, para com isso nos aproximar de novas substâncias farmacológicas. Neste particular, dos estudos experimentais, o estado atual do conhecimento em modelos animais de THB é bastante limitado, carecendo de um modelo de referência.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1. Objetivo Geral**

Avaliar alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pela administração ICV de OUA em ratos Wistar.

### **2.2.2. Objetivos Específicos**

2.2.2.1 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA no comportamento de locomoção de ratos Wistar (artigo 1, replicado nos artigos 2, 3, 4 e 5).

2.2.2.2 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA ao dano em DNA através do teste cometa em tecido sanguíneo de ratos Wistar (artigo 1).

2.2.2.3 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA no nível de BDNF em tecido cerebral de ratos Wistar (artigo 2).

2.2.2.4 Avaliar o efeito do Li e VPT no comportamento de locomoção de ratos Wistar que receberam administração ICV de OUA, empregando os modelos prevenção e reversão do (artigo 3)

2.2.2.5 Avaliar o efeito do Li e VPT no nível de BDNF em tecido cerebral de ratos Wistar que receberam administração ICV de OUA, empregando os modelos de prevenção e reversão (artigo 3)

2.2.2.6 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido cerebral de ratos Wistar, bem como efeito do Li e VPT nestas em modelos de prevenção e reversão (artigo 4).

2.2.2.7 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA na produção de TBARS em partículas submitocondrial do tecido cerebral de ratos Wistar, bem como efeito do Li e VPT nestas em modelos de prevenção e reversão (artigo 4).

2.2.2.8 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA na produção de proteínas carboniladas em tecido cerebral de ratos Wistar, bem como efeito do Li e VPT nestas em modelos de prevenção e reversão (artigo 4).

2.2.2.9 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA na atividade das enzimas CAT e da SOD em tecido cerebral de

ratos Wistar, bem como efeito do Li e VPT nestas em modelos de prevenção e reversão (artigo 4).

2.2.2.10 Avaliar os efeitos da administração ICV de OUA na atividade da SOD em partículas submitocondriais do tecido cerebral de ratos Wistar, bem como efeito do Li e VPT nestas em modelos de prevenção e reversão (artigo 4).

2.2.2.11 Avaliar os efeitos da administração ICV de BDNF no comportamento de locomoção de ratos submetidos da administração ICV de OUA (artigo 5).

2.2.2.12 Avaliar os efeitos da administração ICV de BDNF sobre produção de TBARS e proteínas carboniladas no cérebro de ratos submetidos da administração ICV de OUA (artigo 5).

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1. Desenho experimental

Trata-se de pesquisa experimental pré-clínica, com elementos de validação de face, construto e valor preditivo em modelo animal de mania.

### 2.3.2. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (aproximadamente 60 dias de vida) procedentes do biotério da universidade onde está sendo realizada a presente pesquisa. Os ratos ficaram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (claro: 07:00 às 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ .

### 2.3.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos a anestesia com cloridrato de cetamina 90 mg/Kg e xilasina intramuscular (IM). No aparelho estereotáxico, inicialmente foi removido a pele e o couro cabeludo dos ratos na região do crânio. Em seguida, inserido uma cânula de 1 mm, colocada mediante as seguintes coordenadas: 0.9 mm posterior ao bregma; 1.5 mm a direita da linha média; sendo a cânula assim implantada à 2.6 mm de profundidade no ventrículo lateral. A fixação da cânula foi feita com cimento acrílico. Por fim, a injeção ICV de 5  $\mu\text{l}$  de líquido artificial (aCSF sigla do inglês) ou OUA (concentração  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  M) ocorreu após 72 horas da cirurgia (Machado-Vieira, *et al.*, 2004b). Estas doses de OUA foram definidas com base em estudos prévios realizados por este grupo de pesquisa (Zugno *et al.*, 2009; Riegel *et al.*, 2010). Por questões éticas e logísticas, conforme andamento da tese, os últimos experimentos passaram a empregar somente a dose  $10^{-3}$  M, que se mostrou suficiente para os estudos e permitiu a redução de animais envolvidos em pesquisa.

### 2.3.4 Procedimentos experimentais

#### 2.3.4.1 Tempos avaliados

Os dois primeiros artigos desta tese foram delineados a fim de avaliar o efeito da administração ICV de OUA ou aCSF ao longo de sete dias. Tiveram analisados os efeitos imediatamente após a administração de OUA (designado efeito agudo), 3h, 24h e 7 dias após. Sendo que a hiperlocomoção causada pela administração ICV de OUA persistiu por

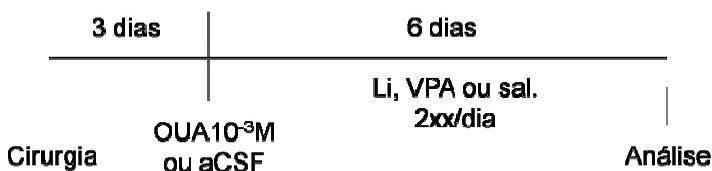
vários dias (Decker *et al.*, 2000; El-Mallakh *et al.*, 2006), nos três últimos artigos, os experimentos foram delineados a fim de avaliar os efeitos de OUA 7 dias após a administração.

#### 2.3.4.2 Modelo de reversão e modelo de prevenção

Para validação preditiva do modelo, foram empregados também 2 tipos de experimentos, reversão e prevenção. Esta estratégia visa replicar as situações clínicas de tratamento dos episódios maníacos (reversão) e de prevenção de episódio (também chamada fase de manutenção). Nos 2 modelos o tratamento injetou-se intra peritonealmente Li (47,5 mg/kg), VPT (200 mg/kg) ou solução salina (SAL) duas vezes por dia por.

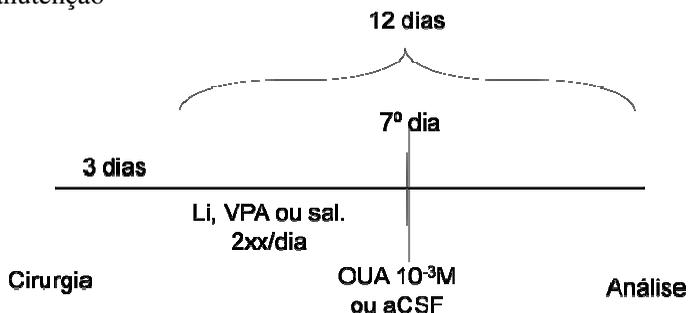
2.3.4.2.1 Modelo de reversão ou tratamento de episódio maníaco: A partir do dia seguinte ao da injeção de OUA ou aCSF, os ratos receberam injeções intraperitoneal (IP), durante 6 dias, de SAL, Li ou VPT (figura 2.3.4.2.1). O experimento utilizou 6 grupos experimentais com 12 animais por grupo, somando 72 no experimento agudo e 72 no experimento crônico (n=144), sendo os grupos: 1) aCSF + SAL; 2) aCSF + Li; 3) aCSF + VPT; 4) OUA + SAL; 5) OUA + Li; 6) OUA + VPT.

Figura 2.3.4.2.1: representação esquemática do modelo de reversão



2.3.4.2.2 Modelo de prevenção ou manutenção: O modelo de prevenção está resumido na figura 2.3.4.2.2. Após a recuperação do ato cirúrgico, os animais (n = 144) receberão injeções IP de Li (47,5 mg/kg), VPT (200mg/kg) ou SAL duas vezes por dia por 12 dias. No sétimo dia com administração de SAL, Li ou VPT, os animais receberão uma dose de OUA ( $10^{-3}$ M) ou aCSF, totalizando 6 grupos experimentais agudos e 6 crônicos, com 12 animais por grupo, assim designados: SAL + aCSF, Li + aCSF, VPT + aCSF, SAL + OUA, Li + OUA, VPT + OUA.

Figura 2.3.4.2.2: Representação esquemática do modelo de manutenção



### 2.3.4.3 Administração de BDNF recombinante humano

No último experimento desta tese, intitulado artigo 5 (embora trate-se um manuscrito, uma vez que não está aceito ou publicado), foi aplicado BDNF recombinante humano nos animais, buscando avaliar um caminho diferente de experimentos anteriores que observaram esta neurotrofina como desfecho da pesquisa. A administração ocorreu 15 minutos após a infusão de OUA ou aCSF, da seguinte forma: BDNF recombinante humano (0,25 mg em 1  $\mu$ l) ou aCSF (1  $\mu$ l) no ventrículo lateral. Isso resultou em 4 grupos: 1) aCSF + aCSF; 2) aCSF + BDNF; 3) OUA + aCSF; 4) OUA + BDNF. Foi avaliada atividade locomotora e medidas bioquímicas 7 dias após as administrações ICV.

### 2.3.5 Avaliações comportamentais

A atividade comportamental avaliada foi a atividade locomotora, sendo a hiperlocomoção, o parâmetro adotado como equivalente de mania induzida no modelo animal. O teste comportamental adotado para avaliar a atividade motora foi a tarefa de habituação ao campo aberto (*Open Field Test*), designada daqui para frente apenas como teste de campo aberto. 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 são colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que

explorem a arena por 5 minutos, onde serão contados os cruzamentos entre as linhas pretas (*crossings*) e a quantidade de vezes em que o rato fica apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (*rearings*).

Um mesmo animal é submetido a 3 sessões no campo aberto, sendo elas: 1) antes da cirurgia; 2) 72 horas após a cirurgia; 3) imediatamente após a administração ICV de OUA ou SAL, 3 h, 24 h ou 7 dias após a administração. O 'n' para avaliação comportamental foi adotado de 12 animais por grupo com base em estudos previamente publicados (Zugno et al., 2009; Frey et al., 2006a). As avaliações 1 e 2 servem de parâmetro de pareamento entre os grupos e as sessões no momento 3 para comparação de efeitos.

A avaliação comportamental está presente em mais de uma sessão de resultados (artigos), isto ocorreu por solicitação de revisores dos periódicos enviados. Em suas avaliações, estes entenderam que cada artigo deveria ter validação de face. Portanto, devido a esta necessidade alguns dados foram replicados, entendemos que isso não vá de contra ao princípio ético de usar o mínimo de animais suficientes para a produção do conhecimento.

### **2.3.6 Avaliações bioquímicas**

Imediatamente após a última avaliação da atividade locomotora, os animais foram decapitados, o cérebro removido e dissecado. A dissecação isolou para análise os tecidos do córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, que permaneceram a  $-80^{\circ}$  C até a análise bioquímica, descrita nos subitens abaixo. O 'n' adotado para as avaliações bioquímicas foi o mínimo de 5 animais por grupo, este tamanho amostral foi obtido com base em estudos previamente publicados (Réus et al., 2008; Walz et al., 2008; Riegel et al., 2010). Por questões logísticas e éticas, buscou-se a realização de artigos com menor uso de materiais e custos, os quais permitissem a demonstração suficiente de dados. Isso implicou que nem sempre estas três estruturas anatômicas foram avaliadas num mesmo experimento ou artigo.

#### **2.3.6.1. Mensurações de estresse oxidativo**

2.3.6.1.1 Medida de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): como índice de peroxidação lipídica foi medido a concentração de TBARS tecidual durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Esterbauer & Cheeseman, 1990). Brevemente, as amostras

obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico, fervida por 15 minutos, e após a quantidade de TBARS foram determinada pela absorbância em 535 nm através do espectrofotômetro.

2.3.6.1.2 Medida do dano oxidativo em proteínas: o dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito (Klamt *et al.*, 2001). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilhidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm através do espectrofotômetro.

2.3.6.1.3 Atividade da SOD e da CAT: a atividade destas enzimas antioxidantes foram aferidas conforme previamente descrito (respectivamente Boveris, 1984 e Aebi, 1984). A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm através do espectrofotômetro e a atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito.

2.3.6.1.4 Mensuração de superóxido mitocondrial: brevemente, as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação e rompidas por congelamentos sucessivos. Após, a cadeia de transporte de elétrons foi alimentada com succinato na presença de CAT e a produção de superóxido aferida pelo grau de oxidação da adrenalina conforme previamente descrito (Boveris, 1984).

#### 2.3.6.2. Avaliação de dano ao DNA

Para avaliação de dano ao DNA foi empregado o teste cometa em liquor, hipocampo e sangue periférico. Também em sangue periférico foi avaliado um segundo marcador que foi o Ensaio de Micronúcleos. O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e o tecido cerebral conforme metodologia descrita no início desta seção.

2.3.6.2.1 Teste Cometa: o protocolo padrão para a preparação e análises deste teste adotado foi o previamente descrito por Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (2000). Os esfregaços foram preparados pela mistura de 5µl de sangue ou de homogenato (com tampão PBS), córtex pré-frontal e hipocampo, com 90µl de agarose LMP (0,75%). A mistura (células/agarose) foi adicionada a uma lâmina revestida com uma

camada de 300µl de agarose NMP. Após a solidificação, as lâminas foram postas em soluções lise (NaCl 2.5M, EDTA 100mM e Tris 10mM, pH 10,0 – 10,5), adicionadas a Triton X-100 1% e sulfóxido dimetil (DMSO) 10%. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 12,6) por 30min. O DNA foi electrofosforisado 30min 25 V (0.90 V/cm) e 300mA, o tampão foi neutralizado com Tris 0.4M (pH 7,5). Finalmente, o DNA foi corado com brometo de etídio. (As lâminas coradas foram analisadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 200 a 400x).

2.3.6.2.2 Ensaio de micronúcleo (MN): o sangue periférico foi obtido seguindo os protocolos padrão (Krishna *et al.*, 2000). Esfregaços para o ensaio de MN foram feitas com as mesmas amostras de sangue utilizadas para o ensaio do cometa. Dois esfregaços de sangue total de cada animal foram realizadas em lâminas de microscópio previamente limpas, secas ao ar à temperatura ambiente, e coradas em 5% de Giemsa (Merck) em tampão de fosfato (pH 5,8) durante 10 min. Os diapositivos foram codificados, e as células foram marcados cegamente por microscópio de luz a 1000x ampliação. Para cada indivíduo, a proporção de eritrócitos policromáticos (PCES) de eritrócitos normocromáticos (ENC) foi determinado em um total de 1.000 eritrócitos por animal para avaliar a citotoxicidade, bem como a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em 2000 eritrócitos por rato foi gravado para avaliar genotoxicidade.

#### 2.3.6.3. Mensuração de níveis de Neurotrofinas

O marcador bioquímico de disfunção das neurotrofinas no SNC avaliado na presente tese foi a redução dos níveis de BDNF. Foram analisados por imunoenensaio (ELISA Sanduíche) através dos kits da Chemicon International e R&D Systems, respectivamente (Frey *et al.*, 2006a; Frey *et al.*, 2006c).

### 2.3.7 Análise estatística

Os dados foram tabulados e avaliados com programa estatístico Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 17.0. Os 4 primeiros artigos tiveram análise estatística semelhantes. Para a atividade locomotora a diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA sigla do inglês) de uma via. Quando o

valor de  $F$  foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. Para os ensaios bioquímicos a diferença entre os grupos foi avaliada pela ANOVA. Quando o valor de  $F$  foi significativo, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Newman-Keuls. No último manuscrito foi realizado ANOVA de duas vias, onde uma via foi a administração de BDNF ou aCSF e a outra de OUA ou aCSF. O nível de significância adotado foi de 95% ou erro  $\alpha=5\%$ .

### **2.3.8 Aspectos éticos**

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além disso foram seguidas as recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os estudos desta tese foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta universidade, que constam em 2 projetos: 1) Avaliação das alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pela administração intracerebroventricular de OUA em ratos: implicação como um modelo animal de mania (protocolo número: 32/2009); 2) Avaliações das alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intracerebroventricular de em ratos: Implicação para a consolidação de um modelo animal de transtorno bipolar (protocolo número: 37/2012)

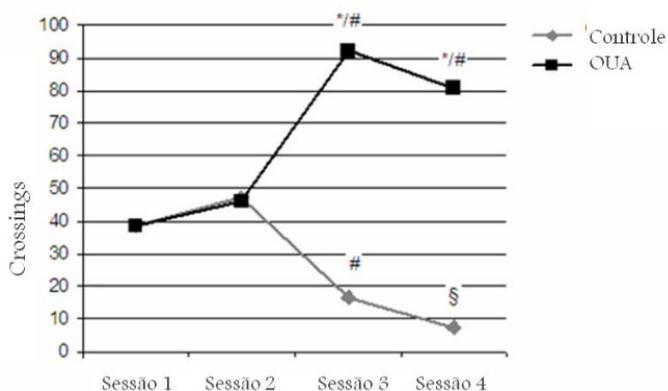
## 2.4 RESULTADOS

Os resultados estão divididos de acordo com os cinco manuscritos enviados para periódicos científicos, no decorrer da produção desta tese. No momento desta defesa, três estão publicados, um aceito e um último aguardando parecer de revisores. Optou-se por ordená-los de uma forma didática que não obrigatoriamente seguiu a ordem cronológica de envio para os periódicos e publicação.

### **2.4.1 Resultados do Artigo 1: atividade motora e dano ao DNA** (Jornada *et al.*, 2010a)

Como ilustrado na Figura 2.4.1.1, a locomoção espontânea dos animais submetidos ao aparelho de campo aberto durante as sessões 1 (antes da cirurgia) e 2 (três dias após a cirurgia) não foi diferente entre os dois grupos. No entanto, a administração ICV de OUA ocasionou aumento da locomoção espontânea nos ratos comparado com o grupo controle imediatamente após a injeção (sessão 3), e esta hiperlocomoção (comparação com controle) ainda foi observada sete dias após injeção única ICV de OUA (sessão 4),  $P < 0,01$ . Os animais que não receberam a substância do modelo apresentaram redução da atividade motora com a repetição das sessões no aparato do campo aberto ( $p < 0,05$ ), efeito conhecido como habituação, isso não ocorreu com os animais que receberam a substância do modelo que além de aumentarem a atividade da sessão 2 para 3, apresentaram resultados estatisticamente significativo entre as sessões 3 e 4.

Figura 2.4.1.1 – Efeitos da injeção ICV de OUA ou solução salina no número de ‘crossings’ em ratos submetidos ao teste de campo aberto, durante 5 min. A atividade locomotora avaliada em quatro vezes: antes da cirurgia(Sessão 1); sobre o terceiro dias após a cirurgia (Sessão 2), imediatamente após a injeção de OUA ICV ou solução salina (Sessão 3) e 7 dias após a injeção ICV (Sessão 4). \*  $p < 0,01$  vs grupo de soro fisiológico, de acordo com o teste t de Student. #  $p < 0,05$  em comparação com sessão 2, analisados pelo teste t de Student. §  $p < 0,05$  em comparação com a Sessão 3, analisados pelo teste t de Student.



Como mostrado na Figura 2.4.1.2 (página seguinte), na injeção de OUA ICV, não houve diferença de danos ao DNA no LCR dos animais. No entanto, a administração de OUA aumentou significativamente o dano ao DNA no hipocampo e no sangue,  $p < 0,001$  na comparação com o grupo controle. Os resultados de teste de micronúcleos são mostrados na Figura 2.4.1.3, onde a OUA não alterou a frequência de micronúcleos em comparação com o grupo de controle no sangue de ratos.

Figura 2.4.1.2 – Efeitos da injeção ICV de 5  $\mu$ L de veículo (aCSF) ou OUA (10<sup>-3</sup> M dissolvida em aCSF) no índice de danos no liquor, sangue e hipocampo de ratos, avaliadas com ensaio Cometa. As barras representam as médias e as linhas os desvios padrão. \*  $p < 0,01$  vs grupo de soro fisiológico, de acordo com o teste t de Student.

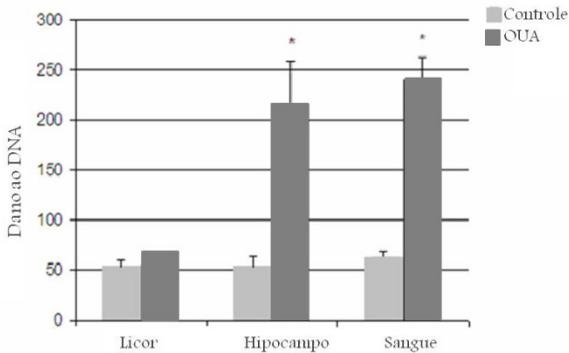
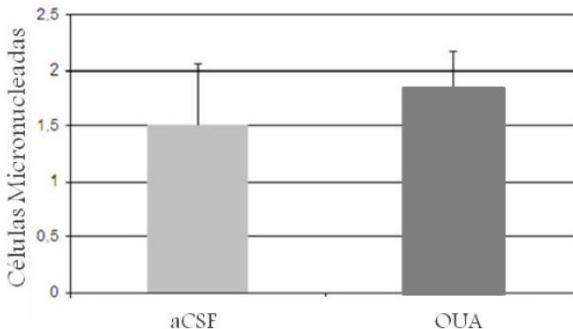


Figura 2.4.1.3 – Efeitos da injeção ICV de 5  $\mu$ L de veículo (aCSF) ou OUA (10<sup>-3</sup> M dissolvida em aCSF) sobre a frequência de micronúcleos de eritrócitos em ratos. As barras representam as médias e as linhas os desvios padrão. Não houve diferença significativa na comparação de grupo OUA vs grupo de soro fisiológico, de acordo com o teste t de Student.

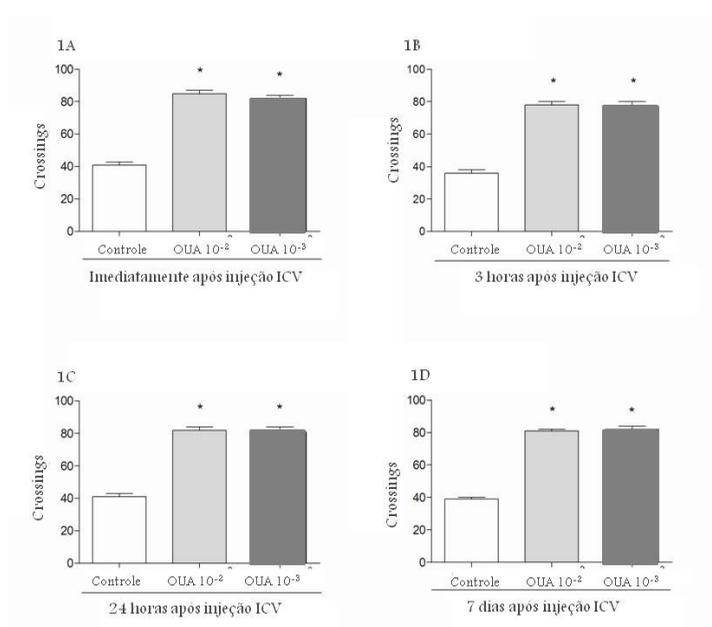
#### 2.4.2.



## Resultados do Artigo 2: atividade motora e níveis de BDNF (Jornada et al., 2012 – no prelo)

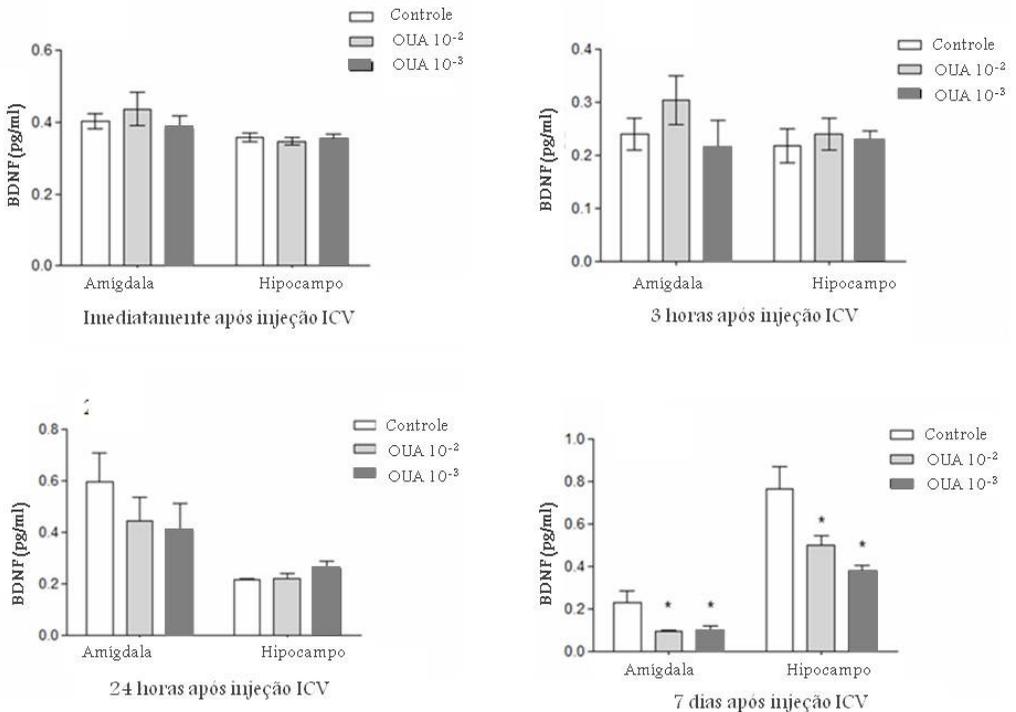
Os resultados para a atividade locomotora são mostrados na figura 2.4.2.1. Quando avaliada imediatamente, 3 horas, 24 horas ou 7 dias após a injeção ICV de OUA ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  M) aumentaram a locomoção espontânea de ratos, comparação com o grupo de controle.

Figura 2.4.2.1 – Atividade locomotora imediatamente (1A), 3 horas (1B), 24 horas (1C) e 7 dias (1D) após a injeção de 5  $\mu$ L de aCSF, OUA  $10^{-2}$  M ou  $10^{-3}$  M ICV. As barras representam as médias de ‘crossings’ e as linhas o erro padrão. \* P <0,05 vs grupo aCSF, de acordo com ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.



Tal como ilustrado na figura 2.4.2.2, quando avaliada imediatamente, 3 horas e 24 horas após a injeção ICV, OUA em doses de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  M, não altera os níveis de BDNF, tanto na amígdala e no hipocampo. No entanto, quando avaliada 7 dias após a injeção ICV, a ouabaína, em doses de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  M, houve uma redução significativa nos níveis de BDNF na amígdala e no hipocampo.

Figura 2.4.2.2 – Níveis de BDNF no hipocampo e amígdala de ratos imediatamente (2A), 3 horas (2B), 24 horas (2C) e 7 dias (2D) após a injeção de 5  $\mu$ L de aCSF, OUA  $10^{-2}$  M ou  $10^{-3}$  M ICV. As barras representam as médias e as linhas os erros padrão das médias de 7 animais. \*  $P < 0,05$  vs grupo aCSF, de acordo com a análise de variância, seguida pelo teste de Tukey.

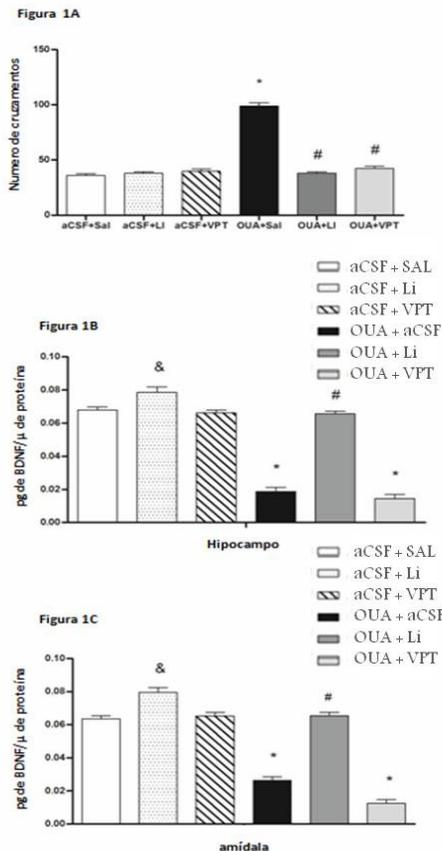


### **2.4.3 Resultados do Artigo 3: reversão e prevenção da redução do BDNF com Li e VPT (Jornada *et al.*, 2010b)**

No primeiro experimento (modelo reversão), a OUA aumentou a atividade locomotora em ratos tratados com SAL logo após sua administração ICV e este efeito persistiu por 7 dias após uma única dose, (dados semelhantes aos dois artigos anteriores). Entretanto, o Li e o VPT reverteram estes efeitos relacionados com a OUA sob o comportamento hiperativo. Vale ressaltar que administração de Li ou VPT, em animais tratados com aCSF não alterou os dados comportamentais, indicando que os efeitos dos estabilizadores de humor em ratos tratados com OUA não estão associados à sedação (Figura 2.4.3.1A).

A administração de OUA diminuiu os níveis de BDNF tanto no hipocampo (Figura 2.4.3.1B) quanto na amígdala (Figura 2.4.3.1C), no entanto, apenas o tratamento com Li reverteu este prejuízo no BDNF desencadeado pela OUA, nas duas áreas cerebrais. As análises subsequentes evidenciaram que: em animais em uso de aCSF, o uso de Li aumentou os níveis de BDNF nas duas estruturas avaliadas, enquanto o VPT não teve esta influencia (Figura 2.4.3.1B e 2.4.3.1C).

Figura 2.4.3.1 - MODELO DE REVERSÃO: Número de 'crossings' em ratos submetidos ao teste do campo aberto durante 5 min (1A); níveis de BDNF no hipocampo (1B) e amígdala (1C) após a injeção de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup>M ICV. As barras representam médias e as linhas os erros padrão das médias (15 animais por grupo de 'crossings' e 5 animais de cada grupo de BDNF). \* P <0,05 vs aCSF + SAL grupo, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste Tukey. # P <0,05 comparado com o grupo OUA+SAL de acordo com ANOVA seguido pelo teste Tukey (gl=5, F=153, P<0,0001; hipocampo BDNF: gl= 5, F=368,367, P<0,0001; BDNF amígdala: (gl=5, F=235,519, P<0,0001). & P<0,05 vs aCSF + SAL grupo de acordo Teste t (BDNF no hipocampo: t=2,905, P<0,011; BDNF amígdala: t= 3,697, P<0,002).



A figura 2.4.3.2 resume os resultados do modelo de prevenção de recaídas ou manutenção. A administração ICV de OUA aumentou imediatamente o comportamento locomotor (2A), efeito que persistiu por 7 dias após uma única injeção (dados já nos dois artigos anteriores). O pré-tratamento tanto com Li, quanto com VPT foram capazes de impedir a hiperatividade relacionados com a OUA (2A). A administração de aCSF em animais tratados previamente com estabilizador do humor não demonstrou nenhum efeito comportamental (2A). Neste experimento, a OUA diminuiu os níveis de BDNF no hipocampo (2B) e amígdala (2C) em ratos que tratados anteriormente com solução salina, enquanto apenas o pré-tratamento com Li impediu o comprometimento do BDNF nestas estruturas cerebrais após a administração de OUA, efeito não observado com o VPT (2B e 2C). Nos animais tratados com aCSF, o uso crônico de Li aumentou a expressão de BDNF no hipocampo e amígdala, enquanto o VPT não teve influência nos níveis de BDNF nestas estruturas (2B e 2C).

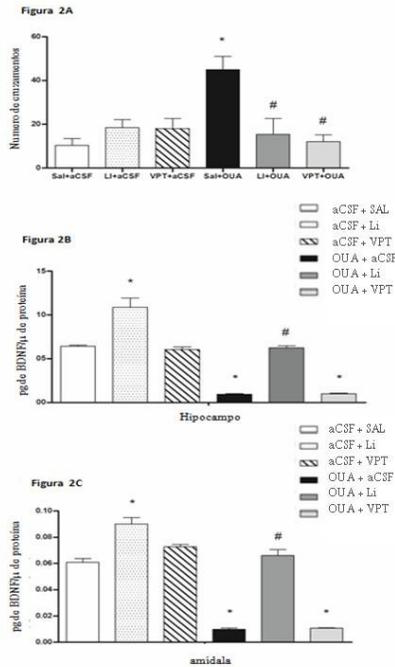


Figura 2.4.3.2 - MODELO DE MANUTENÇÃO - Número de ‘crossings’ em ratos submetidos ao teste de campo aberto durante 5 min (2A) e os níveis de BDNF no hipocampo (2B) e na amígdala (2C), 7 dias após uma única injeção de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA  $10^{-3}$  M ICV. As barras representam as médias e as linhas os erros padrão (15 animais de cada grupo de ‘crossing’ e 5 animais de cada grupo para BDNF). \* P <0,05 vs grupo aCSF+SAL, de acordo com ANOVA seguido pelo teste Tukey. # P<0,05 comparado com grupo OUA+SAL. Atividade motora:  $g1=5$ ,  $F=5,851$ ,  $P<0,001$ ; BDNF em hipocampo:  $g1=5$ ,  $F=75,156$ ,  $P<0,001$ ; BDNF em amígdala:  $g1=5$ ,  $F=135,897$ ,  $P<0,001$ .

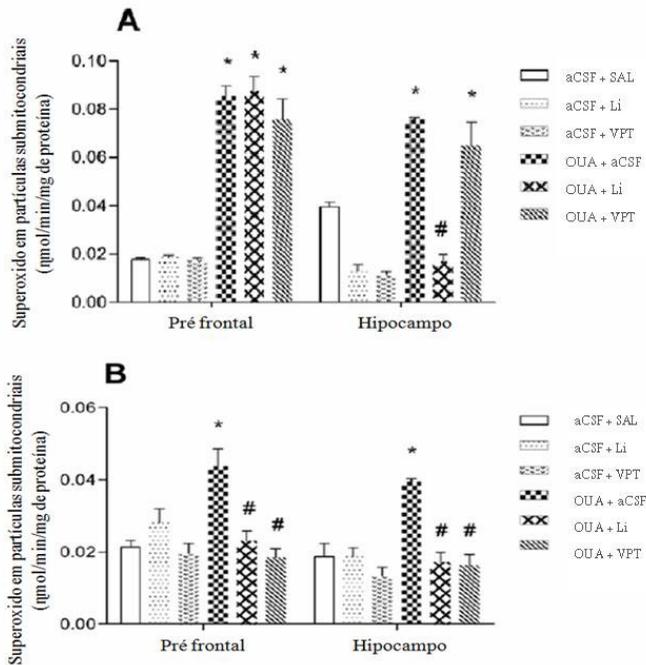
#### **2.4.4. Resultados do Artigo 4: estresse oxidativo (Jornada *et al.*, 2011)**

##### 2.4.4.1 Superóxido em partícula submitocondrial

Como mostrado na fig. 2.4.4.1 no item A, no modelo de reversão, houve um aumento significativo no conteúdo de superóxido no grupo OUA+SAL no córtex pré-frontal e hipocampo quando comparados com o grupo aCSF+SAL ( $p < 0,05$ ). O Li reverteu o aumento de superóxido pela OUA no hipocampo ratos ( $p < 0,05$ ), mas o VPT não. No entanto, no prefrontal tanto Li quanto VPT, não foram capazes de reverter o aumento induzido por ouabaína nos níveis submitocondriais de superóxido.

No item B da mesma figura, observa-se que no modelo de manutenção também ocorreu um aumento significativo nos níveis de superóxido em pré-frontal e hipocampo, quando empregado OUA+Sal na comparação com aCSF+SAL ( $p < 0,05$ ). Já neste experimento, Li e VPT preveniram este aumento em ambas estruturas ( $p < 0,05$ ).

Figura 2.4.4.1 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup> M ICV nos níveis superóxido em partículas sub-mitocondriais do córtex pré-frontal e hipocampo de ratos no modelo de reversão (A) (pré-frontal: gl=5, F=49,213, p<0,001; hipocampo: gl= 5, F=31,973, p<0,001) e no modelo de manutenção (B) (pré-frontal: gl= 5, F = 8,760, p<0,001; hipocampo: gl= 5, F=11,029, p<0,001) Barras representam médias  $\pm$ erro-padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \* p <0,05 vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguida do teste de Tukey. # p <0,05 em comparação grupo OUA+SAL.



#### 2.4.4.2 TBARS em partículas submitocondriais

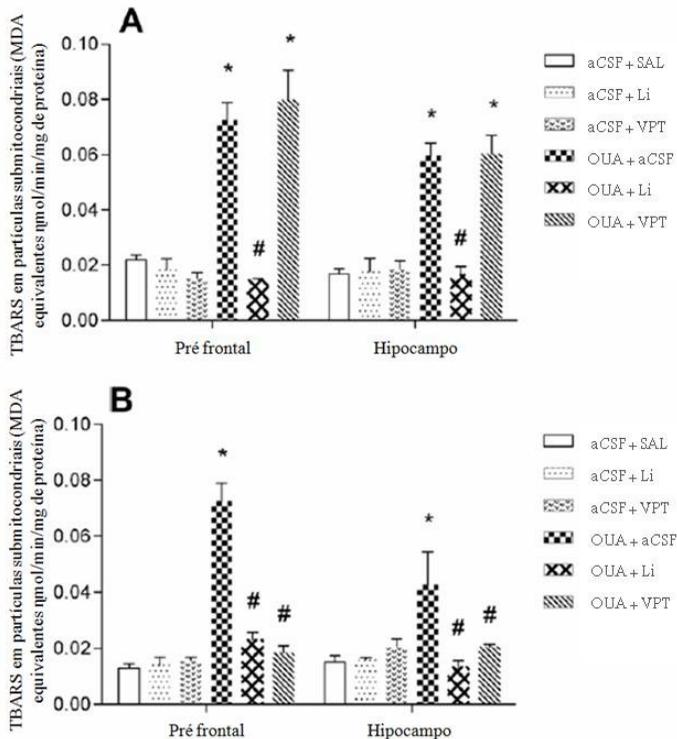
A comparação dos valores de TBARS em partículas submitocondriais entre os seis grupos do modelo de reversão é mostrado na parte A da figura 2.4.4.2 O grupo OUA+SAL, quando comparados com o grupo de aCSF+SAL, apresentou um aumento significativo da quantidade de TBARS em partículas submitocondriais do córtex pré-frontal e hipocampo ( $p < 0,05$ ). Novamente o Li reverteu este valor em ambas as estruturas ( $p < 0,05$ ) e o VPT não.

O modelo de manutenção é mostrado parte B da mesma figura. O grupo SAL+OUA apresentou quantidade superior de TBARS em partículas submitocondriais, tanto em pré-frontal quanto hipocampo. Em outras palavras, isso quer dizer que quando comparada com a do grupo de controle Sal + aCSF a OUA aumentou os níveis de TBARS ( $p < 0,05$ ) e que Li (OUA+LI) e VPT (OUA+VPT) preveniram este aumento em ambas as estruturas ( $p < 0,05$ ).

B

at  
at  
at  
O  
O  
O

Figura 2.4.4.2 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup>M ICV nos níveis de TBARS em partículas submitocondrial do córtex pré-frontal e hipocampo no modelo de reversão (A) (pré-frontal: gl=5, F=31,954, p<0,001; hipocampo: gl=5, F=29,258, p<0,001) e no modelo de manutenção (B) (pré-frontal: gl = 5, F = 44,923, p <0,001; hipocampo: gl = 5, F = 4,655, p <0,007). As barras representam as médias e as linhas os erros padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \* p <0,05 vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. # p <0,05 comparado com o grupo OUA+SAL.

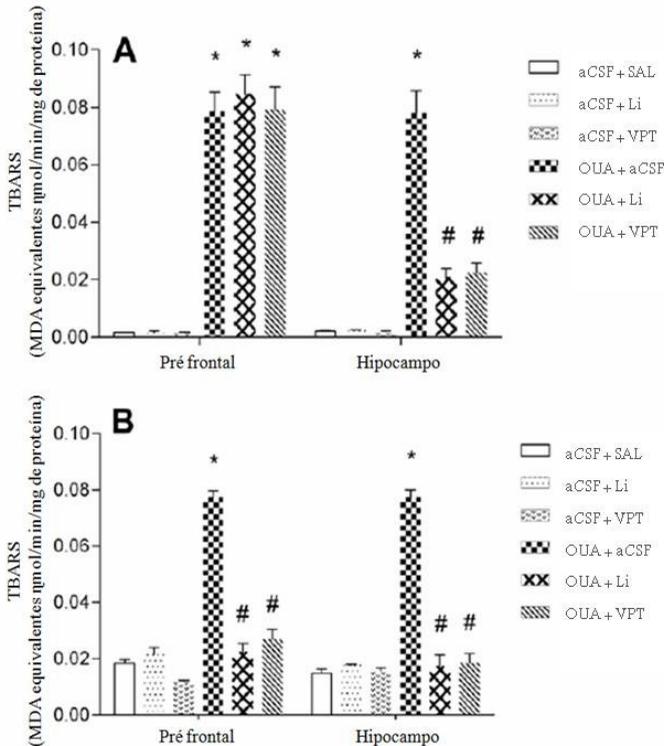


#### 2.4.4.3 TBARS em tecido cerebral

A figura 2.4.4.3 ilustra os níveis de TBARS agora em masserado de tecido cérebral dos ratos, com a mesma didática das anteriores, na porção A o modelo de reversão e na parte B o de manutenção. A administração de ouabaina ICV (grupo OUA + Sal), resultou num aumento da quantidade TBARS no córtex pré-frontal e hipocampo ( $p < 0,05$ ). Neste experimento, Li e VPT foram capazes de reverter este aumento somente no hipocampo ( $p < 0,05$ ).

Do mesmo modo, a administração de ouabaina (SAL+OUA) em protocolo de manutenção (B), também resultou num aumento acentuado da quantidade de TBARS no córtex pré-frontal e hipocampo ( $p < 0,05$ ). Mais uma vez, Li e VPT foram capazes de prevenir o aumento deste indicador de dano a lipídeos causado pela OUA, em ambas as estruturas neuroanatômicas.

Figura 2.4.4.3 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup>M ICV nos níveis de TBARS do córtex pré-frontal e hipocampo modelo de reversão (A) (pré-frontal: gl=5, F=40,471, p <0,001; hipocampo: gl=5, F=28,992, p<0,001) e no modelo de manutenção (B) (pré-frontal: gl=5, F=93,414, p<0,001; hipocampo: gl=5, F=118,134, p <0,001). As barras representam as médias e as linhas os erros padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \* p <0,05 vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. # p <0,05 comparado com o grupo OUA+SAL.

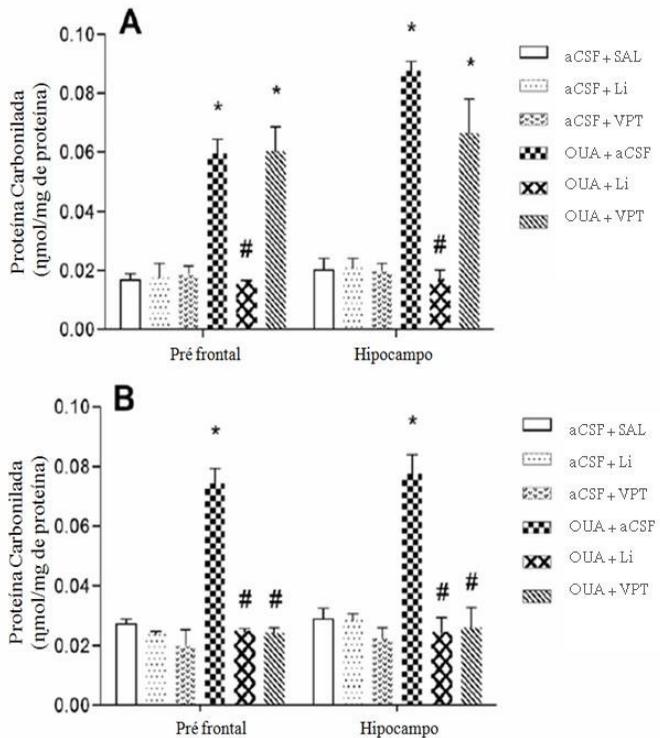


#### 2.4.4.4 Formação de grupos carbonil em tecido cerebral

Como mostrado na figura 2.4.4 4, no modelo de reversão (A), novamente houve um aumento significativo no córtex pré-frontal e hipocampo, do grupo OUA+Sal quando comparado com o grupo de controle ( $p < 0,05$ ), desta vez na formação da proteínas do grupo carbonil. O Li, mas não VPT, reverteu estes valores significativamente no córtex pré-frontal e hipocampo ( $p < 0,05$ ).

A parte B da figura mostra a carbonilação de proteína no cérebro de ratos, em modelo de manutenção. O grupo que Sal + OUA mostrou um aumento significativo nos índices proteína carboniladas nas duas estruturas. Ou seja, a OUA aumentou o indicador de dano a proteína no grupo que recebeu somente SAL ( $p < 0,05$ ), e os moduladores de humor foram capazes de prevenir este efeito.

Figura 4.4 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA  $10^{-3}$ M ICV na formação de proteína carbonilada no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos, no modelo de reversão (A) (pré-frontal:  $gl=5$ ,  $F=23.480$ ,  $p<0,001$ ; hipocampo:  $gl=5$ ,  $F=24.541$ ,  $p<0,001$ ) e no modelo de manutenção (B) (pré-frontal:  $gl=5$ ,  $F=49.265$ ,  $p<0,001$ ; hipocampo:  $gl=5$ ,  $F=19.833$ ,  $p<0,001$ ). As barras representam as médias e as linhas os erros padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. #  $p < 0,05$  comparado com o grupo OUA+SAL.

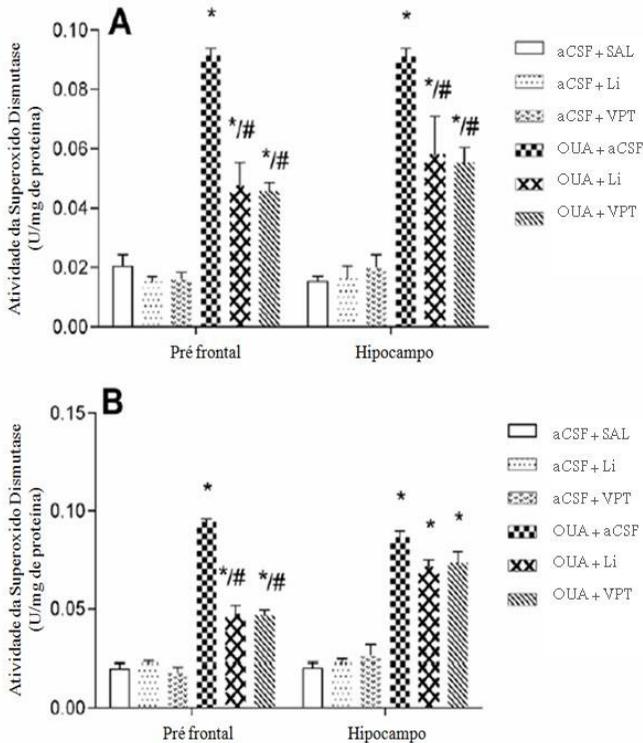


#### 2.4.4.5 Atividade da enzima Superóxido-Dismutase (SOD)

A atividade SOD no modelo de reversão (figura 2.4.4.5 A) foi maior nos homogeneizados de pré-frontal e hipocampo do grupo OUA+Sal do que no grupo de controle ( $p < 0,05$ ). A administração de Li e VPT fizeram com que os parâmetros se reduzissem em comparação aos que receberam OUA ( $p < 0,05$ ) no entanto, não reduziram a ponto de atingir atividade enzimática semelhante ao controle ( $p < 0,05$ ).

Uma vez mais, no modelo de manutenção (figura 2.4.4.5B) no grupo Sal+OUA também ocorreu um aumento acentuado do parâmetro estudado nas duas estruturas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o uso de Li e VPT reduziu parcialmente estes valores em córtex pré-frontal ( $p < 0,05$ ), mas não no hipocampo.

Figura 2.4.4.5 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup>M ICV atividade da superóxido-dismutase no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos em modelo de reversão (A) (pré-frontal: gl=5, F=65,241, p<0,001; hipocampo: gl=5, F=22,932, p<0,001) e no modelo de manutenção (B) (pré-frontal: gl=5, F=139,135, p<0,001; hipocampo: gl=5, F=70,726, p<0,001). As barras representam as médias e as linhas os erros padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \* p <0,05 vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. # p <0,05 comparado com o grupo OUA+SAL.

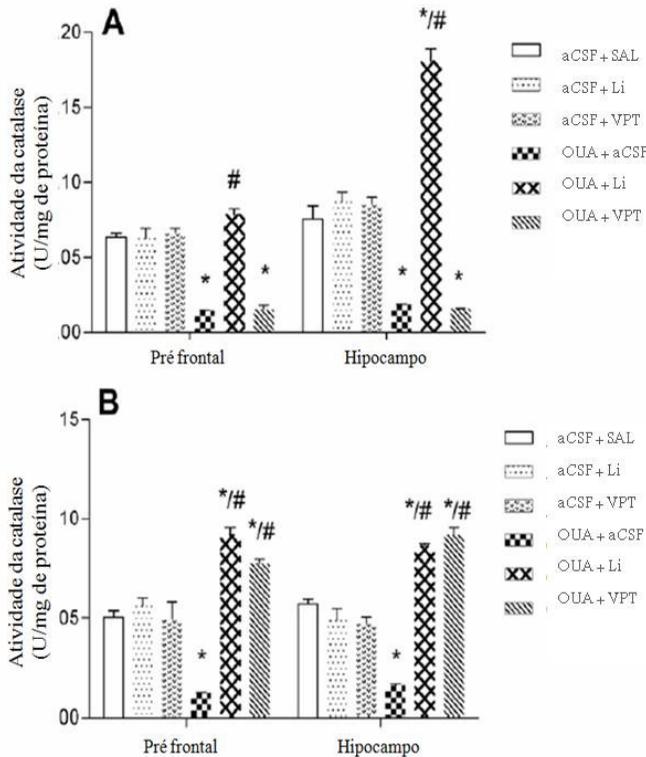


#### 2.4.4.6 Atividade da enzima CAT

Os resultados da atividade da CAT são apresentados na Figura 2.4.4 6. No modelo de reversão (A), a atividade da CAT foi significativamente diminuída em OUA+SAL comparada com grupo controle ( $p < 0,05$ ). O Li, mas não o VPT, reverteu estes valores em ambas as estruturas ( $p < 0,05$ ).

Na manutenção (B), a administração de ouabaina (SAL+OUA) também provocou uma marcada diminuição da atividade da CAT nas duas estruturas ( $p < 0,05$ ). Os fármacos foram capazes de prevenir a diminuição da atividade da CAT induzida por OUA, também em ambas as estruturas testadas.

Figura 2.4.4.6 - Efeitos da administração de 5  $\mu$ L de aCSF ou OUA 10<sup>-3</sup>M ICV atividade da catalase no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos de tratamento de reversão (A) (prefrontal:  $gl=5$ ,  $F=72,457$ ,  $p<0,001$ ; hipocampo:  $gl=5$ ,  $F=117,860$ ,  $p<0,001$ ) e no tratamento de manutenção (B) (pré-frontal:  $gl=5$ ,  $F=40,607$ ,  $p<0,001$ ; hipocampo:  $gl=5$ ,  $F=55,919$ ,  $p<0,001$ ). As barras representam as médias e as linhas os erros padrão de 5 ou 6 animais por grupo. \*  $p<0,05$  vs. grupo aCSF, de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey. #  $p<0,05$  comparado com o grupo OUA+SAL.



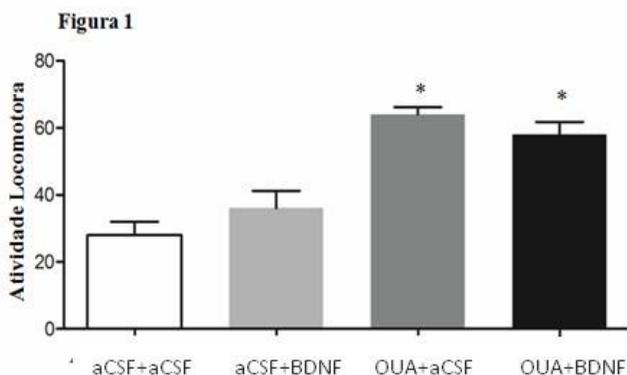
É digno de nota que Li e VPT nos grupos de controle (aCSF ou Sal) não alteraram qualquer um dos parâmetros medidos em todos os protocolos experimentais.

### 2.4.5. Resultados do artigo 5: administração de BDNF e estresse oxidativo (artigo enviado para publicação)

#### 2.4.5.1 Atividade motora

Como pode ser observado na Figura 2.4.5.1, a administração de OUA aumentou a locomoção dos animais. A administração ICV de BDNF não reverteu a hiperatividade induzida por ouabaína nos ratos. A seguir os dados provenientes da ANOVA de duas vias para administração de ouabaína [ $F(1,36)=116,52$ ;  $p < 0.001$ ], tratamento com BDNF [ $F(1,36) = 0.0024$ ;  $p = 0.096$ ] e interação entre tratamento com BDNF versus administração de ouabaína [ $F(1,36) = 1.02$ ];  $p = 0.318$ ].

Figura 5.1 - Efeitos da administração ICV BDNF sobre a atividade locomotora, no modelo animal de mania induzida por OUA. As barras representam as médias de 'crossings' e as linhas os erros padrão. \*  $p < 0,05$  vs grupo aCSF + aCSF, de acordo com a ANOVA de duas vias.

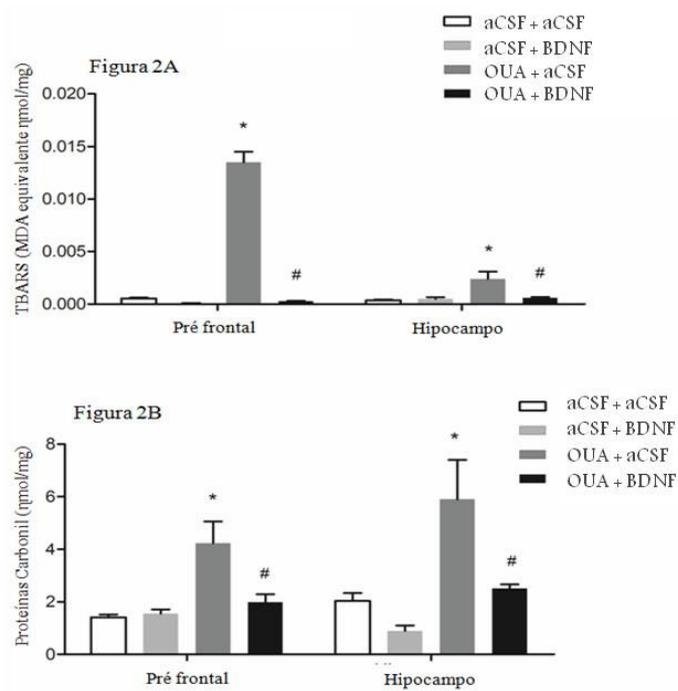


#### 2.4.5.2 Estresse oxidativo

A figura 2.4.5.2, no item 2A, mostra a formação de TBARS nas amostras de tecido cerebral, que é um parâmetro de dano a lipídios. A administração de OUA aumentou a formação de TBARS no pré-frontal e hipocampo de ratos. A administração ICV de BDNF protegeu o cérebro dos animais contra o aumento de dano a lipídio induzido por OUA. A seguir os dados provenientes da ANOVA de duas vias para administração de OUA [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=76,49$ ,  $p < 0,001$ ; hipocampo:  $F(1,16)=6,88$ ,  $p < 0,001$ ], tratamento com BDNF [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=82,7$ ,  $p < 0,001$ ; hipocampo:  $F(1,16)=3,98$ ,  $p=0,06$ ] e interação entre tratamento com BDNF versus administração de OUA [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=74,4$ ;  $p < 0,001$ ; hipocampo:  $F(1,16)=5,41$ ,  $p=0,03$ ].

A figura 2.4.5.2, no item 2B, mostra a quantidade de formação de grupos carbonil nas amostras de tecido cerebral, que é um parâmetro de avaliação de dano à proteína. Como podemos observar a OUA aumenta a formação de grupos carbonila no córtex pré-frontal e hipocampo dos ratos. A administração ICV de BDNF protege o cérebro contra a formação de grupos carbonila induzida por OUA em ambas às estruturas cerebrais analisadas. A seguir os dados provenientes da ANOVA de duas vias para administração de ouabaína [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=12,26$ ,  $p < 0,01$ ; hipocampo:  $F(1,16)=20,15$ ,  $p < 0,001$ ], tratamento com BDNF [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=5,76$ ,  $p < 0,03$ ; hipocampo:  $F(1,16)=12,97$ ,  $p < 0,01$ ] e interação entre tratamento com BDNF versus administração de OUA [córtex pré-frontal:  $F(1,16)=6,56$ ;  $p < 0,003$ ; hipocampo:  $F(1,16)=3,2$ ,  $p=0,09$ ].

Figura 2.4.5.2 - Efeitos da administração ICV BDNF em pré-frontal e hipocampo no modelo animal de mania induzido por OUA. As barras representam as médias e as linhas os erros padrão. (A) Níveis de TBARS; (B) Formação de proteína do grupo carbonil. \* $p < 0,05$  vs grupo aCSF+aCSF, de acordo com a ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey. #  $p < 0,05$  vs grupo OUA+aCSF, de acordo com a ANOVA de duas vias.



## 2.5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados na seção anterior demonstram que o modelo com o inibidor da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, OUA, apresentou elementos de validade de face, construto e valor preditivo em ratos. A hiperlocomoção, comportamento que representa uma validação de face, foi encontrada nos artigos 1 (imediatamente e 7 dias após injeção ICV de OUA  $10^{-3}\text{M}$ ), artigo 2 (imediatamente, 3 horas, 24 horas e 7 dias após  $10^{-2}\text{M}$  e  $10^{-3}\text{M}$ ), artigo 3 e 5 (ambos 7 dias após  $10^{-3}\text{M}$ ). A validade de construto está presente nas alterações bioquímicas semelhantes ao que ocorre no THB, nos achados: a) indicativo de dano à DNA em hipocampo e sangue através do teste de cometa (artigo 1); b) redução dos níveis de BDNF em hipocampo e amígdala 7 dias após com OUA  $10^{-2}\text{M}$  e  $10^{-3}\text{M}$  (artigo 2) e replicado no artigo 3 com OUA  $10^{-3}\text{M}$ ; c) aumento dos marcadores de estresse oxidativo TBARS e grupo carbonil em córtex pré-frontal e hipocampo, bem como redução da enzima CAT, 7 dias após OUA  $10^{-3}\text{M}$  (artigo 4). Por fim, a validade preditiva está contemplada nos indicativos: a) reversão e prevenção da hiperlocomoção com uso de Li e VPT (artigo 3); b) reversão e prevenção da redução do BDNF em amígdala e hipocampo com Li e VPT (artigo 3); c) reversão dos marcadores de estresse oxidativo em pré-frontal e hipocampo com Li e algumas vezes com VPT também, bem como a prevenção das alterações com os dois fármacos em pré-frontal e hipocampo (artigo 4).

### 2.5.1 Atividade motora

Estudos anteriores mostraram que a administração imediata de OUA ICV em ratos pode produzir comportamento *maniaco-like* (El-Mallakh et al, 1995; Ruktanonchai et al, 1998; Decker et al, 2000; Kim et al, 2008). Ruktanonchai e colegas (1998) demonstraram que a hiperatividade induzida pela OUA permanece cerca de 1 semana, e sugeriram que este aumento persistente da atividade locomotora está associado ao aumento de unidades da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase no hipocampo e uma diminuição na atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. A inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase induz a despolarização, indutor de excitação neuronal (McCaarren e Alger, 1987), o que pode estar relacionado com a atividade locomotora aumentada. No presente estudo, foi demonstrado que a administração ICV de OUA ocasionou aumento da atividade

locomotora em ratos, e esta continua a ser hiperatividade 7 dias após uma injeção única ICV, replicando estudos anteriores.

Um primeiro resultado que deve ser lembrado é que, entre os grupos aCSF e OUA, os animais apresentavam características semelhantes inclusive atividade locomotora, antes da cirurgia estereotáxica e 3 dias após a mesma. Portanto os grupos podem ser considerados bem pareados até o momento da administração de OUA ou aCSF. Após a administração de OUA que ocorreram as alterações.

Os resultados do primeiro artigo desta tese, mostraram que a injeção ICV de OUA induz hiperlocomoção imediatamente e após sete dias de uma única injeção (comportamento *maníac-like*), sugerindo que inibição da atividade cerebral  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase provoca hiperatividade. No segundo, os dados foram replicados em diferentes demonstrando hiperatividade quando avaliada imediatamente, 3 horas, 24 horas e sete dias após a injeção ICV.

No artigo 3, não houve aumento da locomoção induzida pela OUA, em animais que receberam Li e VPT. Estes dados não só replicaram estudos prévios de hipermotricidade com OUA como acrescentaram informação inédita de reversão e manutenção com os estabilizadores de humor Li e VPT, que seriam equivalentes clínicos de tratamento de mania aguda e prevenção de recaída respectivamente. Antes disso, El-Mallakh e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia de Olanzapina e Haloperidol em animais que receberam OUA, fármacos não são medicamentos de primeira linha ou mais usados para esta doença. A literatura sugere que uma pequena diminuição na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pode resultar em hiperexcitabilidade neuronal, dando origem aos sintomas de mania, tais como hiperatividade (El-Mallakh, 1983).

Outro dado importante deste artigo, nos animais que receberam aCSF os moduladores de humor não reduziram a atividade motora. Este dado é importante para a validação do modelo animal uma vez que, a pesar dos fármacos serem sabidamente sedativos isto não ocorreu na avaliação do número de crossings entre os controles. Com isso, exclui-se o viés de confusão por sedação.

### **2.5.2 Análises bioquímicas**

Primeiro, demonstrado que a injeção OUA induziu um aumento significativo no dano do DNA no hipocampo e no sangue dos ratos.

Curiosamente, já anteriormente demonstrado um aumento nos danos do DNA em amostras de hipocampo e do sangue, em um modelo animal de mania dopaminérgica induzida pela anfetamina (Andreazza et al., 2008). Andreazza e colaboradores (2007a) mostraram que os danos em DNA foram significativamente aumentados em pacientes com THB, e este dano no DNA foi correlacionada com a gravidade dos sintomas de depressão e mania.

Xie et al (1999) demonstraram que a inibição parcial da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pela OUA aumenta a produção de EAO. Distúrbios no equilíbrio entre a formação de EAO e da eficiência dos mecanismos antioxidantes levaram ao estresse oxidativo. No artigo 4 (Jornada *et al.*, 2011) foram encontrados diversos indicadores de estresse oxidativo nos animais que receberam a OUA. Este estresse oxidativo pode causar danos a macromoléculas importantes, como DNA, proteínas e lipídios (Scibior-Bentkowska e Czczot, 2009), o que pode ser uma explicação para fisiopatologia para o dano ao DNA encontrado no presente estudo.

No experimento, não encontramos mudanças na frequência de micronúcleos, estes resultados sugerem que a OUA induz apenas danos transitórios ao DNA. Sabe-se que existem múltiplos sistemas de reparação dos danos que podem evitar lesões duradouras (Evan e Littlewood, 1998; Cooke et al, 2005; Culmsee e Mattson, 2005). Isto sugere que a OUA pode ter efeitos genotóxicos transitórios, no entanto não parecem ser mutagênicos. Além disso, é importante ressaltar que o dano no DNA detectado com o teste do cometa poderia dar origem não só a danos citogenéticos, mas também a mutações pontuais, que não são detectáveis pelo teste de micronúcleos.

Os dados demonstraram que o aumento persistente na locomoção espontânea de ratos, induzido por OUA, está associado com um aumento de dano ao DNA nas amostras de hipocampo e de sangue. No entanto, não observamos um aumento na frequência de micronúcleos, sugerindo que o dano ao DNA possa ser transitório, podendo ter sido reparado por sistemas endógenos de reparação.

No artigo 2 (Jornada *et al.*, 2012), demonstrou-se que OUA não altera imediatamente os níveis de BDNF no hipocampo e amígdala, entretanto após sete dias estes níveis estavam reduzidos. A inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase induz alterações nas concentrações de íons intracelulares, o que pode induzir alterações secundárias na atividade de vias de sinalização intracelular (Nesher *et al.*, 2007). No entanto, estas alterações não obrigatoriamente ocorrem de forma imediata, o que pode

explicar o observado na avaliação de sete dias após a injeção. Além disso, o BDNF pode não estar alterado imediatamente após a administração de OUA porque a síntese ou degradação do BDNF leva um certo tempo.

Palomino *et al.* (2006), em um estudo com pacientes bipolares que experimentaram um primeiro episódio psicótico, observou uma diminuição dramática nos níveis de plasma BDNF do pacientes. É interessante notar que os níveis de BDNF em todas as instâncias aumentaram progressivamente para os valores semelhantes aos controles durante 1 ano de acompanhamento (Gratacos *et al.*, 2007), que pode ser relacionado com o efeito neuroprotetor do tratamento utilizado nos pacientes deste autor.

Um crescente corpo de evidências mostrou que a fisiopatologia do THB poderia ser o resultado da desregulação da plasticidade sináptica com alterações jusante de neurotrofinas (Gratacos *et al.*, 2007). Estudos de neuroimagem sugerem que os níveis de BDNF diminuído podem explicar mudanças estruturais do cérebro em pacientes bipolares (Sheline *et al.*, 1996; Manji e Duman, 2001). Kapczinski *et al.* (2008), mostraram que os níveis séricos de BDNF estão reduzidos durante mania e episódios depressivos, sendo normalizada em eutímia. Além disso, tratamentos agudos com psicoestimulantes, tais como anfetaminas, diminuem os níveis de BDNF tecidos cerebrais de ratos, acompanhados com hiperlocomoção (Frey *et al.*, 2006a).

Inúmeros pesquisadores demonstraram que os estabilizadores do humor mais comumente utilizados, Li e VPT, têm um efeito neuroprotetor importante no tratamento agudo e crônico, atenuando alterações neurodegenerativas causadas por várias doenças (Vajda, 2002; Rowe e Chuang, 2004). Muitos estudos mostram que o efeito neuroprotetor do Li e do VPT poderiam ser os responsáveis por seus efeitos terapêuticos (Li *et al.*, 2002). Um dos mecanismos de ação destas drogas é o aumento dos níveis de BDNF, polipeptídio que tem um papel importante na sobrevivência e diferenciação neuronal em adultos (Huang e Reichardt, 2001), atuando em mecanismos de plasticidade neuronal, como o potencial em longo prazo de aprendizagem e memória (Schinder e Poo, 2000; Huang e Reichardt, 2001; Malcangio e Lessmann, 2003).

Um achado interessante que se pode observar neste trabalho é que o tratamento com Li bloqueia, ou reverte, a diminuição do BDNF induzida por OUA. Contudo, o que parece acontecer é que o tratamento

com Li isoladamente, tanto no modelo de reversão quanto no de prevenção, eleva significativamente os níveis de BDNF, e que esta elevação neutraliza os efeitos da OUA. Por outro lado, o tratamento apenas com VPT não tem esse efeito, não elevando o BDNF quando administrado sozinho, e nem bloqueando a diminuição de BDNF induzida por OUA. Juntos, esses dados podem sugerir duas hipóteses: (1) Li e VPT têm mecanismo de ação diferente para o controle de sintomas maníacos e que (2) não é necessário reverter a queda do BDNF induzida por OUA para que os medicamentos em questão revertam a mania induzida por OUA.

Neste estudo 4 (Jornada et al., 2011) foi demonstrado que a OUA induz dano oxidativo em vários protocolos experimentais, incluindo aumentando a quantidade de superóxido submitocondrial, TBARS (tecidual e submitocondrial) e proteína carbonilada, em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos. Curiosamente, o dano oxidativo induzido por OUA foi acompanhado por um aumento na atividade de SOD e diminuição na atividade de CAT. A SOD é uma enzima capaz de reduzir o radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é o substrato para CAT. Quando a célula aumentou os níveis de SOD sem um aumento proporcional das peroxidases, o excesso de  $H_2O_2$  produzido poderia ser responsável pelos danos oxidativos na célula. Além disso, o  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição e gerar o radical hidroxila, que é o mais prejudicial radical (Halliwell e Gutteridge, 1999). Por conseguinte, a expressão elevada de SOD sem um aumento compensatório no CAT tem efeitos nocivos sobre a célula.

Evidências da literatura têm demonstrado que indivíduos com transtorno bipolar têm aumentado soro TBARS no episódio maníaco inicial (Frey et al, 2007; Machado-Vieira et al, 2007), e em todas as fases da doença bipolar (Andreazza et al., 2007b). Além disso, as atividades de enzimas antioxidantes também são alterados em pacientes bipolares. A atividade da SOD no soro é aumentada em pacientes bipolares em mania e estados depressivos, enquanto que a atividade da CAT no soro foi diminuída em eutímicos e os estados de mania (Andreazza et al, 2007b; Frey et al., 2007).

Um dos principais achados deste artigo na manutenção, foi que Li e VPT aumentaram a atividade da CAT no córtex pré-frontal e hipocampo dos ratos, evitando o dano oxidativo induzido por OUA em manutenção protocolo. No entanto, no protocolo de reversão, somente o Li aumentou a atividade da CAT em ambas as estruturas testadas. Isso

pode explicar a reversão do o aumento induzida por OUA dos marcadores de estresse oxidativo: carbonilação de proteínas, superóxido, TBARS. Esta discrepância entre os moduladores de humor sugere que, quando co-administrada com OUA, Li pode ter o seu efeito antioxidante em um curso de tempo menor do que VPT.

No estudo anterior, com um modelo animal de mania dopaminérgico, nosso laboratório descobriu que anfetamina (ANF) aumenta os danos em DNA no sangue periférico e no hipocampo de ratos. O índice de danos no DNA foi correlacionado positivamente com a peroxidação de lipídeos, enquanto que Li e VPT foram capazes de modular o balanço oxidativo e prevenir danos ao DNA recente (Andreazza et al., 2008). Machado-Vieira e colegas (2007) mostraram que TBARS e atividade enzimas antioxidantes (SOD e CAT) foram aumentadas em pacientes não medicados maníacos em comparação com os controles, e aguda do tratamento com Li mostraram uma redução significativa tanto na relação SOD / CAT e os níveis de TBARS. Além disso, e Bhalla Dhawan (2009) demonstraram que a peroxidação de lipídeos e aumento de espécies reativas de oxigênio induzida por alumínio foram reduzidos após a suplementação com Li.

Stork e Renshaw (2005) propuseram uma hipótese de disfunção mitocondrial em transtorno bipolar, que envolve fosforilação oxidativa prejudicada, uma mudança resultante para a produção de energia glicolítica, uma diminuição na produção total de energia e / ou disponibilidade de substrato e o metabolismo fosfolipídio alterada. Além disso, estudos post-mortem recentes relataram mudanças em mitocondrial relacionada com a expressão gênica em THB (Iwamoto *et al.*, 2005; Munakata *et al.*, 2005). Diminuição da função mitocondrial, e como consequência prejudicado estado de energia celular, é uma hipótese atraente para explicar a patofisiologia da THB.

Os resultados do quinto artigo da tese (manuscrito enviado para publicação, atualmente em avaliação com revisores no periódico *Journal of Psychopharmacology*), demonstraram que a infusão ICV de BDNF humana recombinante não impediu hiperatividade, entretanto protegeu o cérebro contra o dano oxidativo induzido por OUA. Recentemente foi mostrado um prejuízo significativo da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e aumento da peroxidação de lipídeos no soro de pacientes com THB (Banerjee *et al.*, 2012). No mesmo estudo, o Li induzido melhora a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, o que foi associado com uma redução significativa na peroxidação lipídica. Isso sugere que o aumento da

atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase induzida por lítio pode ser um fator potencial para reduzir o stress oxidativo em pacientes bipolares.

Um estudo clínico demonstrou que os níveis de BDNF são reduzidos durante episódios maníacos e depressivos e recuperam depois do tratamento da mania aguda, sugerindo que o BDNF periférico pode ser utilizado como um biomarcador de estados de humor e progressão da doença para BD (Fernandes et al., 2011). Consistente com esta hipótese, cérebros pacientes com THB apresentaram diminuições significativas na proteína e nos níveis de RNAm de BDNF (Kim *et al.*, 2010).

Tratamentos atualmente aprovados para THB incluem Li, VPT, outros anticonvulsivantes e ainda diversos antipsicóticos. No entanto, muitos pacientes bipolares não respondem adequadamente a estes medicamentos, continuam a ter episódios de humor recorrentes, sintomas residuais, incapacidade funcional, incapacidade psicossocial e comorbidade médica e psiquiátrica significativa (Zarate *et al.*, 2006). O BDNF é uma neurotrofina que é essencial para a sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e desenvolvimento cortical (Chuang, 2005). Por essa razão, o comprometimento dos níveis de BDNF observados em pacientes com THB pode contribuir para a atrofia cerebral e progressivas alterações cognitivas. Com base no conhecimento adquirido a partir de estudos pré-clínicos e clínicos, postulamos a possibilidade futura de apresentações farmacológicas BDNF com melhor aplicabilidade clínica (para uso oral ou IM, por exemplo) trariam rápidos efeitos neuroprotetores em pacientes com THB.

Com este último estudo sugere-se que os níveis baixos de BDNF observados no THB podem estar associados com o dano oxidativo, o qual também é visto em indivíduos com o transtorno. A suplementação com BDNF preveniu alguns danos causados pela OUA já demonstrados no artigo 4. Estudos de avaliação de BDNF como terapia adjuvante no tratamento de pacientes com THB são necessários para entender melhor os efeitos terapêuticos de BDNF.

### **2.5.3 Comportamento e neuroquímica**

A OUA induziu um comportamento semelhante à mania nos ratos, a hiperlocomção, associado a isso também induziu: a) danos transitórios no DNA; b) diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e amígdala; c) indicadores de estresse oxidativo em tecido de córtex pré-

frontal e hipocampo, bem como dano oxidativo em mitocôndrias e neurônios.

As alterações motoras induzidas por OUA foram prevenidas e revertidas com moduladores de humor. As alterações de estresse oxidativo induzidas pelo inibidor da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, de uma forma geral, foram modificadas pelos estabilizadores de humor Li e VPT. Entretanto, somente o Li preveniu e reverteu o dano oxidativo. Finalmente, a administração de BDNF não foi capaz de reverter a hiperlocomoção, mas reverteu os indicadores de dano a lipídeos e proteínas. Com isso, além dos elementos de validade de face, construto e valor preditivo (já mencionados), com estes estudos pode-se sugerir que Li, VPT e BDNF recombinante humano reduzem alterações do modelo animal de mania com OUA por diferentes vias.

#### **2.5.4 Limitações**

Esta tese apresenta as seguintes limitações: a) O THB é uma doença com ciclos de depressão e mania, este modelo animal apresenta características apenas de episódio maníaco, entretanto dados preliminares (não publicados) de experimentos realizados neste mesmo laboratório, tem encontrado alguns indicadores de um quadro depressivo mais tardio. b) Apenas um comportamento, a locomoção dos ratos, foi avaliado. Isto está relacionado a relativa carência de testes comportamentais com equivalente de mania. c) Entre as neurotrofinas, foi avaliado apenas BDNF, no entanto, sabe-se que outras neurotrofinas (NT-3, NT-4 e NGF) estão envolvidos em aspectos de progressão do THB. d) Os neurotransmissores, que estão entre as substâncias mais estudadas em psiquiatria não foram avaliados neste modelo, isto ocorreu por fazerem parte dos estudos de outra colega. e) Por fim, dados de neuroimagem funcional poderiam colaborar com esta validação do modelo animal mas implicariam em uma estrutura laboratorial e técnica que não disponibilizamos.

#### **2.5.5 Outros mecanismos envolvidos**

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase está envolvida no sistema excitatório do glutamato (GLU). Os transportadores de GLU dependem do gradiente de íons gerados pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase para que haja a recaptação desse neurotransmissor (Nanitsos et al., 2005). Dentro da família de transportadores de aminoácidos excitatórios, os transportadores de GLU

são proteínas dependentes de  $\text{Na}^+$  e para serem ativadas necessitam do gradiente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  gerado, principalmente, pela  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase (Rose et al., 2009). Isso sugere que diferente do modelo de indução de mania com ANF, que é dopaminérgico, o modelo com OUA sugere-se que seja glutamatérgico.

Um alvo bioquímico de Li e VPA citado na literatura é a proteína quinase C (PKC), bem como estudos clínicos mostram que o tamoxifeno (um inibidor específico de PKC) possui um elevado potencial terapêutico no tratamento de mania aguda (Zarate et al., 2007; Amrollahi et al., 2011; Yildiz et al., 2011). A PKC tem um papel importante na excitação neuronal e na liberação de neurotransmissores e estudos sugerem que o efeito de Li e VPA sobre essa enzima é um fator fundamental para seus efeitos antimaníacos (Manji & Lenox, 1999; Zarate et al., 2006). A desregulação ou inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase pode estar associada a este sinalizador intracelular envolvido em mecanismos de excitação neuronal.

Embora a OUA bloqueie a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase não se imagina que pacientes com THB tenham esta enzima transmembrana inativa. A ausência total de atividade da mesma seria incompatível com a vida. Dito isso, pode-se aventar diferentes mecanismos fisiopatológicos para causas do transtorno do humor tais como: polimorfismo com enzimas menos 'funcionantes'; fenômenos epigenéticos causando alterações na expressão gênica da enzima ou  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase mais susceptíveis a dano; início da cascata de reações em outro sítio, ou seja a  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPase como um mediador; efeitos de estressores externos em diversos mecanismos neuronais...Enfim, um campo vasto para pesquisas futuras.

### 3. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS FINAIS

O modelo animal de mania induzida por OUA foi capaz de produzir comportamento de hiperlocomção, mesmo após 7 dias de única administração, não podendo desta forma ser considerado apenas efeito estimulante direto. Esta alteração persistente na locomoção, foi revertida e prevenida com fármacos habitualmente empregados no tratamento de humanos com THB. Mais uma vez assinalando, os ratos que receberam aCSF invés de OUA não apresentaram atividade motora diferente nos grupos solução salina, Li ou VPT, descartando viés de confusão por efeito sedativo. Isso permite afirmar que na avaliação comportamental foram obtidos consistentes elementos de validade de face e valor preditivo.

Os dados demonstraram indicadores de dano agudo e possivelmente transitório ao DNA, amostras de hipocampo e de sangue. Considerando as reações agudas do modelo estudado, redução na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase em administração única de OUA, pode-se fazer homologia de um episódio maníaco. Extrapolando um pouco, pode-se supor que uma disfunção persistente ou repetida da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase produziria aspectos da progressão crônica e debilitante da doença.

A redução nos níveis de BDNF induzidas pela OUA não foram imediatas, mas evidentes após 7 dias. Isso sugere uma redução na expressão gênica da neurotrofina e consequentemente um bom dado de validade de construto. O modelo foi reforçado ainda com efeitos do Li como elemento de validade preditiva. A partir destes dados, estudos com sinalizadores intracelulares para melhor compreensão da fisiopatologia do THB e emprego de outros fármacos como modelo de tratamento estão sendo desenvolvidos por outros membros deste mesmo laboratório.

Em síntese, os resultados dos experimentos com indicadores de estresse oxidativo, apóiam a noção de que a OUA induz estresse oxidativo, bem como Li e VPT exercem propriedades antioxidantes no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. Com isso, os achados colaboram para validação do modelo, bem como para compreensão dos mecanismos de tratamentos do THB.

Por fim, no último artigo, com administração ICV de BDNF no modelo animal de mania induzida por OUA foi encontrado associação dos três principais fatores neuroquímicos estudados nesta tese, disfunção na  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ , estresse oxidativo e participação de neurotrofina. Propomos então que a OUA se demonstrou bom modelo animal para estudar todos estes sistemas envolvidos no THB, bem como pode ser uma ferramenta promissora testar novos medicamentos

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, v.105, p.121-126, 1984.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HEGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

AMROLLAHI, Z.; REZAEI, F.; SALEHI, B.; MODABBERNIA, A.H.; MAROUFI, A.; ESFANDIARI, G.R.; et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled 6-week study on the efficacy and safety of the tamoxifen adjunctive to lithium in acute bipolar mania. *J Affect Disord* , v.129, n.1-3, p. 327-331, 2011.

ANAND, A.; VERHOEFF, P.; SENECA, N.; ZOGHBI, S.S.; SEIBYL, J.P.; CHARNEY, D.; INNIS, R,B. Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. *Am J Psychiatry* , v.157, n.7, p.1108–1114, 2000.

ANDREAZZA, A.C.; FREY, B.N.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; SANTIN, A.; et al. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* v.153, n.1, p.27-32, 2007a.

ANDREAZZA, A.C.; CASSINI, C.; ROSA, A.R.; LEITE, M.C.; DE ALMEIDA, L.M.; NARDIN, P. et al Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J. Psychiatr. Res.* v.41 n.6 p. 523-529, 2007b.

ANDREAZZA, A.C., KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; STERTZ, L.; ZANOTTO, C.; RIBEIRO, L.; et al. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*, v.33, n.6, p.516-524, 2008.

BALDESSARINI, R.J.; TONDO, L.; HENNEN, J. Effects of lithium treatment and its discontinuation on suicidal behavior in bipolar manic-depressive disorder. *J Clin Psychiatry*,v.60, supl.2, p.77-84, 1999.

BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of Psychiatric Disorders: Depression and anxiety Disorders. in BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. *Goodman & Gilman, the pharmacological basis of therapeutics, 11.ed.* New York, USA: Mc Graw Hill, 2006, p.429-459.

BANERJEE, U.; DASGUPTA. A.; ROUT, J.K.; SINGH, O.P; Effects of lithium therapy on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> - ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr*, v.37, n.1, p.56-61, 2012.

BELMAKER, R.H. Bipolar disorder. *N Engl J Med*, v.351, n.5, p.476-486, 2004.

BEM-SHACHAR, D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible lincage to dopamine. *J Neurochem*, v.83, n.6, p.1241-1251, 2002.

BENES, F.M.; WALSH, J.; BHATTACHARYYA, S.; SHETH, A.; BERRETTA, S. DNA fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, v.60, n.4, p.359-364, 2003.

BHALLA, P., DHAWAN, D.K. Protective role of lithium in ameliorating the aluminium-induced oxidative stress and histological changes in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, v.29, n.4, p.513-521, 2009.

BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*, v.105, p.429-435, 1984.

BOWLER, R.; CRAPO, J.D. Oxidative Stress in Airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Crit Care Med*, v.166, supl12, p. S38-S43, 2002.

BROOKS, P.J. The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous DNA lesions that cause neurodegeneration in xeroderma pigmentosum. *Neuroscience*, v.145, n.4, p.1407-1417, 2007.

BUSUTTIL, R.; BAHAR, R.; VIJG, J. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. *Neuroscience*, v.145, n.4, p.1341-1347, 2007.

CAGGIULA, M. Neurotrophic factors and clinical recovery in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Scand J Immunol*, v.62, n.2, p.176-182, 2005.

CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; GIUFFRIDA-STELLA, A.M. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res*, v.26, n.6, p.739-764, 2001.

CALABRESE, J.R.; HIRSCHFIEL, R.M.; REED, M. Impact of bipolar disorder on U.S.community sample. *J Clin Psychiatry*, v.64, n.4, p.425-432, 2003.

CHRISTO, P.J.; EL-MALLAKH, R.S. Possible Role of Endogenous Ouabain-like Compounds in the Pathophysiology of Bipolar Illness. *Med Hypotheses*, v.41, n.4, p.378-383, 1993.

CHUANG, D.M. The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann N Y Acad Sci*, v.1053, p.195-204, 2005.

COOKE, M.S.; EVANS, M.D.; DOVE, R.; ROZALSKI, R.; GACKOWSKI, D.; SIOMEK, A.; *et al.* DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res*, v.574, n.1-2, p.58-66, 2005.

COYLE, J.T.; DUMAN, R.S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron*, v.38, n.2, p.157-160, 2003.

CROSS, C.E.; VALACCHI, G.; SHOCK, B.; WILSON, M.; WEBER, S.; EISERICH, J.; *et al.* Environmental Oxidant Pollutant Effects on Biologic System. *Am J Respir Crit Care Med*, v.166, suppl12, p.S44-S50, 2002.

CULMSEE, C.; MATTSON, M.P. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm*, v.331, n.3, p.761-777, 2005.

DECKER, S.; GRIDER, G.; COBB, M.; LI, X-P.; O'MALLEY, H.; EL-MALLAKH, R.S.; *et al.* Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of animal model for bipolar illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.24, n.3, p.455-462, 2000.

DREVETS, W.C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, v.11, n.2, p.240-249, 2001.

DU, J.; GOULD, T.D.; MANJI, H.K. Neurotrophic signaling in mood disorders. In: Gutkind JS (Eds) *Signal transduction and human disease*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003 , pp.411-446.

ELLENBROEK, B.A.; COOLS, A.R. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol*, v.1, n.6, p.469-490, 1990.

EL-MALLAKH, R.S. The Na,K-ATPase hypothesis for manicdepression.I. General considerations. *Med Hypotheses*, v.12, n.3, p.253-268, 1983.

EL-MALLAKH, R.S.; BARRETT, J.L.; JED WYATT, R. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar disorder: Implications of normal development. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, v.3, n.1, p. 37-52, 1993.

EL-MALLAKH, R.S.; HEDGES, S.; CASEY, D. Digoxin encephalopathy presenting as mood disturbance, *J Clin Psychopharmacol*, v.15, n.1, p.82-83, 1995.

EL-MALLAKH, R.S.; EL-MARSI, M.A.; O'MALLEY, H.; LI, X-P.; DECKER, S.; LEVY, R.S.; Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disord*, v.5, n.5, p. 362-365, 2003.

EL-MALLAKH, R.S.; DECKER, S.; MORRIS, M.; LI, X-P.; O'MALLEY, H.; EL-MARSI, A.; *et al.* Efficacy of olanzapine and haloperidol in an animal model of mania; *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.30, n.7, p.1261-1264, 2006.

EINAT, H.; YUAN, P.; GOULD, T.D.; LI, J.; DU, J.; MANJI, H.K.; *et al.* The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood regulation. *J Neurosci*, v.23, n.19, p.7311-7316, 2003.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymol*, v.186, p.407-421, 1990.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. *Science*, v.281, n.5381, p.1317-1322, 1998.

FERNANDES, B.S.; GAMA, C.S.; CERESÉR, K.M.; YATHAM, L.N.; FRIES, G.R.; COLPO, G.; *et al.* Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: a systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*, v.45, n.8, p.995-1004, 2011.

FISCHER, J.C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMP, J.H.; STADHOUDERS, A.M.; *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*, v.153, n.1, p.23-36, 1985.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.222, n.3, p.236-245, 1999.

FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; CERESÉR, K.M.M.; MARTINS, M.R.; VALVOSSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; *et al.* Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sciences*, v.79, n.3, p.281-286, 2006a.

FREY, B.N.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; MARTINS, M.R.; PETRONILHO, F.C.; BARDINI, K.; *et al.* Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an

animal model of mania. *J Psychiatr Neurosci*, v.31, n.5, p.326-332, 2006b.

FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; ROSA, A.R.; MARTINS, M.R.; VALVASSOR, S.S; RÉUS, G.Z; *et al.* Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol*, v.17, n.4, p.311-318, 2006c.

FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; KUNZ, M. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.31, n.1, p.283-285, 2007.

GRATACOS, M.; GONZALEZ, J.R.; MERCADER, J.M.; CID, R.D.; URRETAVIZCAYA, M.; ESTIVILL, X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v.61, n.7, p.911-922, 2007

GOODWIN, F.K.; JAMISON, K.R. *Manic-Depressive Illness: Bipolar and Recurrent Unipolar Disorders, 2nd.* New York, USA: Oxford University Press, 2007.

HAMID, H.; GAO, Y.L.; ZHENMIN, L.Z.; HOUGLAND, M.T.; EL-MALLAKH, R.S. Effect of ouabain on sodium pump alpha-isoform expression in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.33, n.7, p.1103-1106, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine 3ed.* London, UK: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative disease: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, v.19, n.9, p.685-716. 2001.

HENNION, J.P.; EL-MARSI, M.A.; O'MALLEY, H.; EL-MALLAKH, R.S. Evaluation of neuroprotection by lithium and valproic acid against ouabai-induced cell damage. *Bipolar Disord*, v.4, n.3, p.201-206, 2002.

HIRSCHFESD, R.M.; WEISSMAN, M.M.; DAVIS, K.L.; CHARNEY, D.; COYLE, J.T. Risk factors for major depression an bipolar disorder, in: NEMEROFF, C.B. (ed.). *Neuropsychopharmacology: The fifth Generation of Progress*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2002, pp.1017-1025.

HIRSCHFEL, R.M.; LEWIS, L.; VORNIK, L.A. Perceptions and impact of bipolar disorder: how far have we really come? Results of National Depressive and Manic-Depressive Association 2000 survey of individuals with bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*, v.64, n.2, p.161-174, 2003.

HOUGLAND, M.T.; GAO, Y.; HERMAN, L.A.; NG, C.K.; LEI, Z.; EL-MALLAKH, R.S. Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose-F18 in na animal model of mania. *Psychiatry Res*, v.164, n.2, p.166-171, 2008.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neural development and function. *Annu Rev Neurosci*, v.24, p.677-736, 2001.

HUFF, M.O.; LI, X-P.; GINNS, E.; EL-MALLAKH, R.S. Effect of ethacrynic acid on the sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase activity and expression in Old Order Amish bipolar individuals. *J Affect Disord*, v.123, n.1-3, p.303-307, 2010.

HUGHES, B.P. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta*, v.7, p.597-603, 1962.

IWAMOTO, K.; BUNDO, M.; KATO, T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*, v.14, n.2, p.241-253, 2005.

JORNADA, L.K.; VALVASSORI, S.S.; ARENT, C.O.; LEFFA, D.; DAMIANI, A.A.; HAINZENREDER, G.; *et al.* DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats. *Neurosci Lett*, v.47, n.1, p 6–9, 2010a.

JORNADA, L.K.; MORETTI, M.; VALVASSORI, S.S.; FERREIRA, C.L.; PADILHA, P.T. ARENT, C.O.; et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res*, v. 44, n.8, p.506-510, 2010b.

JORNADA, L.K.; VALVASSORI, S.S.; STECKERT, A.V.; MORETTI, M.; MINA, F.; FERREIRA, C.L.; et al. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J Psychiatr Res*, v.45, n.2, p.162-168, 2011.

JORNADA, L.K.; VALVASSORI, S.S.; RESENDE, W.R.; MORETTI, M.; FERREIRA, C.L.; FRIES, G.; et al. Decrease BDNF levels in amygdala and hippocampus after intracerebroventricular administration of ouabain. *Rev Psiq Clín*, v.39, n.5, 2012 (no prelo).

JOYCE, P.R.; FERGUSON, D.M.; WOOLLARD, G.; ABBOTT, R.M.; HORWOOD, L.J; UPTON, J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder. *J Affect Disord*, v.33, n.4, p.233-243, 1995.

JUDD, L.L.; AKISKAL, H.S.; SCHETTLER, P.L. The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry*, v.59, n.6, p.530-537, 2002.

KAUER-SANT'ANNA, M.; YATHAM, L.N.; TRAMONTINA, J.; WEYNE, F.; CERESER, K.M.; GAZALLE, F.K.; et al. Emotional memory in bipolar disorder. *Br J Psychiatry*, v.192, n.6, p.458-463, 2008.

KALB, R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci*, v.28, n.1, p.5-11, 2005.

KAPCZINSKI, F.; FREY, B.N.; KAUER-SANT'ANNA, M.; GRASSI-OLIVEIRA, R.; BERK, M. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother*, v.8, n.7, p.1101-1113, 2008.

KATO, T.; KATO, N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, v.2, n.3Pt1, p.180-190, 2000.

KIM, S.H.; YU, H.S.; PARK, H.G.; JEON, W.J.; SONG, J.Y.; KANG, U.G.; *et al.* Dose-dependent effect of intracerebroventricular injection of ouabain on the phosphorylation of the MEK1/2-ERK1/2-p90RSK pathway in the rat brain related to locomotor activity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.32, n.7, p.1637-1642, 2008.

KIM, H.W.; RAPOPORT, S.I.; RAO, J.S. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. *Neurobiol Dis*, v.37, n.3, p.596-603, 2010.

KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; CONTE DA FROTA, M.L.; WALZ, R.; ANDRADES, M.E.; DA SILVA, E.G.; *et al.* Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med*, v.30, n.10, p.1137-1144, 2001.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay protocol; conduct and data interpretation. *Mutat Res*, v.455, n.1-2, p.155-166, 2000.

KULOGLU, M.; USTUNDAG, B.; ATMACA, M.; CANATAN, H.; TEZCAN, A.E.; CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct*, v.20, n.2, p.171-175, 2002.

KUPFER, D.J. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA*, v.293, n.20, p.2528-2530, 2005.

LEDOUX, S.P.; DRUZHYNIA, N.M.; HOLLENSWORTH, S.B.; HARRISON, J.F.; WILSON, G.L. Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience*, v.145, n.4, p.1249-1259, 2007.

LESUY, S.F. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas,RS: Editora Ulbra, 2002.

LEES, G.J.; LEONG, W. The sodium-potassium ATPase inhibitor ouabain is neurotoxic in the rat substantia nigra and striatum. *Neurosci Lett*, v.188, n.2, p.113-116, 1995.

LI, R.; EI-MALLAKH, R.S.; HARRISON, L.T.; CHANGARIS, D.G.; LEVY, R.S. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes: towards an animal model for maniac depression. *Mol Chem Neuropathol*, v.31, n.1, p.65-72, 1997.

LI, X.; BIJUR, G.N.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*, v.4, n.2, p.137-144, 2002.

LY, C.V.; VERSTREKEN, P. Mitochondria at the synapse. *Neuroscientist*, v.12, n.4, p.291-299, 2006.

MACHADO-VIEIRA, R.; CERESÉ, K.M.; FREY, B.N.; GAUER, G.J.; C. As bases biológicas da regulação do humor. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. (Eds). *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos, 2ed.* Porto Alegre,RS: Artmed, 2004a, p.251-263.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI F; SOARES JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.28, n.2, p.209-224, 2004b.

MACHADO-VIEIRA, R.; ANDREAZZA, A.C.; VIALE, C.I.; ZANATTO, V.; VARGAS, R.S. et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett*, v.421, n.1, p.33-36, 2007.

MALCANGIO, M.; LESSMANN, V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacological Sci*, v.24, n3, p.116-121, 2003.

MANJI, H.K.; DUMAN, R.S. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the

development of novel therapeutics. *Psychopharmacol Bull*, v.35, n.2, p.5-49, 2001.

MANJI, H.K.; CHEN, G. PKC, MAP kinases and bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry*, v.7, Sup11, p.S46-S56, 2002.

MANJI, H.K.; LENOX, R.H. Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry*, v.46, n.10, p.1328-1351, 1999.

MATSUMOTO, S.; SAIKI, C.; YOSHIDA, S.; TAKEDA, M.; KUMAGAI, Y. Effect of ouabain on the after hyperpolarization of slowly adapting pulmonary stretch receptors in the rat lung. *Brain Res*, v.1107, n.1, p.131-139, 2006.

MCCARREN, M.; ALGER, B.E. Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: role of a Ca<sup>2+</sup>-dependant conductance. *J Neurophysiol*, v.57, n.2, p.496-509, 1987.

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. *Neurobiol Aging*, v.26, n.5, p.587-595, 2005.

MOLINA, M.F.; SANCHEZ-REUS, I.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J. Quercetin, a flavomoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull*, v.26, n.10, p.1398-1402, 2003.

MUNAKATA, K., IWAMOTO, K., BUNDO, M., KATO, T. Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v.57, n.5, p.525-32, 2005.

NANITSOS, E.K.; NGUYEN, K.T.; ST'ASTNÝ, F.; BALCAR, V.J. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: involvement of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. *J Biomed Sci*, v.12, n.6, p.975-984, 2005.

NESHER, M.; SHPOLANSKY, U.; ROSEN, H.; LICHTSTEIN, D. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance. *Life Sci*, v.80, n.23, p.2093-2107, 2007.

NIEDERNHOFER, L.J.; GARINIS, G.A.; RAAMS, A.; LALAI, A.S.; ROBINSON, A.R.; APPELDOORN, E.; *et al.* A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature*, v.444, n.7122, p.1038-1043, 2006.

OBATA, K.; NOGUCHI K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res*, v.55, n.1, p.1-10, 2006.

OZCAN, M.E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*, v.19, n.2, p.89-95, 2004.

PALOMINO, A.; VALLEJO-ILLARRAMENDI, A.; GONZALEZ-PINTO, A.; ALDAMA, A.; GONZALEZ-GOMEZ, C.; MOSQUERA, F.; *et al.* Decreased levels of plasma BDNF in first-episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res*, v.86, n1-3, p.321-322, 2006.

PAYNE, J.L.; QUIROZ, J.A.; GOULD, T.D.; ZARATE, C.A.; MANJ, H.K. Neurobiology of Mental Disorder. In: CHARNEY, D.S.; NESTLER, E.J. (eds). *Neurobiology of Mental Illness*. New York, USA: Oxford University Press, 2003, pp. 397-420.

RAO, K.S. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol*, v.3, n.3, p.162-172, 2007.

RÉUS, G.Z.; VALVASSORI, S.S.; NUERNBERG, H.; COMIM, C.M.; STRINGARI, R.B.; PADILHA, P.T.; *et al.* DNA Damage after Acute and Chronic Treatment with Malathion in Rats. *J Agricultural Food Chem*, v.56, n.16, p.7560-7565, 2008.

RIEGEL, R.E.; VALVASSORI, S.S.; MORETTI, M.; FERREIRA, C.L.; STECKERT, A.V.; DE SOUZA, B.; *et al.* Intracerebroventricular ouabain administration induces oxidative stress in the rat brain. *Int J Dev Neurosci*, v.28,n.3, p.233-237, 2010.

ROSE, E.M.; KOO, J.C.; ANTFLICK, J.E.; AHMED, S.M.; ANGERS, S.; HAMPSON, D.R.. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci*, v.29, n.25, p.8143-8155, 2009.

ROWE, M.K.; CHUANG, D.M. Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Diagn*, v.6, n.21, p.1-18, 2004

RUSH, A.J. Toward na understanding of bipolar disorder and its origin. *J Clin Psychiatry*, v.64, suppl6, p.4-8, 2003.

RUKTANONCHAI, D.J.; EL-MALLAKH, R.S.; LI, R.; LEVY, R.S. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. *Physiol Behav*, v.63, n.3, p.403-406, 1998

SAKAR, A.; BHADURI, A. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constitutes and green tea. *Biochem Biophys Res Commun*, v.284, n.1, p.173-178, 2001.

SCHINDER, A.F.; POO M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neurosci*, v.23, n.12, p.639-645, 2000.

SCHRAMM, A.; SCHULTE, J.H.; ASTRAHANTSEFF, K.; APOSTOLOV, O.; LIMPT, V.; SIEVERTS, H.; *et al.* Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett*, v.228, n.1-2, p.143-153, 2005.

SCIBIOR-BENTKOWSKA, D.; CZECZOT, H. Cancer cells and oxidative stress. *Postepy Hig Med Dosw*, v.63, p.58-72, 2009.

SHALTIEL G; GUANG C; HUSSEINI K; MANJI HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharm*, v.7, n.1, p. 22–26, 2007.

SHELINE, Y.I.; WANG, P.W.; GADO, M.H.; CSERNANSKY, J.G., VANNIER, M.W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci*, v.93, n.3, p. 3908-3913, 1996.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, v.175, n.1, p.184–191, 1988.

SPEARING, M. *Bipolar Disorder*. Washington-DC, USA: NIH Publication, 2001.

STORK, C.; RENSHAW, P.F. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry*, v.10, n.10, p.900-919, 2005.

TEN, H.M.; VOLLEBER, G.H.W.; BIJL, R. Bipolar disorder in the general population in the Netherlands(prevalence, consequence and care utilization): results from the Netherlands Mental Health Surved and Incidence Study (NEMESIS). *J Affect Disorder*, v.68, n. 2-3, p.203-213, 2002.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; *et al*. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

VAJDA, F.J. Valproate and neuroprotection. *J Clin Neurosci*, v.9, n.5, p.508-514, 2002.

WALZ, J.C.; FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; CERESER, K.M.; CACILHAS, A.A.; VALVASSORI, S.S.; *et al*. Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *J Psychiatr Res*, v.42, n.5, p.416-421, 2008.

WILSON, D.M.; MCNEILL, D.R. Base excision repair and the central nervous system. *Neuroscience*, v.145, n.4, p.1187-1200, 2007.

XIE, Z.; KOMETIANI, P.; LIU, J.; SHAPIRO, J.I.; ASKARI, A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, v.274, n.27, p.19323–19328, 1999.

YILDIZ, A.; VIETA, E.; LEUCHT, S.; BALDESSARINI, R.J. Efficacy of antimanic treatments: meta-analysis of randomized, controlled trials. *Neuropsychopharmacology*, v.36, n.2, p.375-389, 2011.

YU, H.S.; KIM, S.H.; PARK, H.G.; KIM, Y.S.; AHN, Y.M. Activation of Akt signaling in rat brain by intracerebroventricular injection of ouabain: A rat model for mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.34, n.6, p.888-894, 2010.

ZARATE Jr, C.A.; SINGH, J.B.; CARLSON, P.J.; QUIROZ, J.; JOLKOVSKY, L.; LUCKENBAUGH, D.A.; MANJI, H.K. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord*, v.9, n.6, p.561-570, 2007.

ZARATE Jr, C.A.; SINGH, J.; MANJI, H.K. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, v.59, n.11, p.1006-1020, 2006.

ZUGNO, A.; VALVASSORI, S.S.; SCHERER, E.B.S.; MATTOS, C.; MATTE, C.; FERREIRA, C.L.; *et al.* Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm*, v.116, n.4, p.431-436, 2009.