

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ROGER BITENCOURT VARELA

**EFEITOS DOS INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASE
SOBRE ENZIMAS EPIGENÉTICAS NO CÉREBRO DE ANIMAIS
SUBMETIDOS A MODELOS DE MANIA E DE DEPRESSÃO**

**CRICIÚMA
DEZEMBRO DE 2018**

ROGER BITENCOURT VARELA

**EFEITOS DOS INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASE SOBRE
ENZIMAS EPIGENÉTICAS NO CÉREBRO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A
MODELOS DE MANIA E DE DEPRESSÃO**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samira Valvassori
Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

**CRICIÚMA
DEZEMBRO DE 2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V293e Varela, Roger Bitencourt.
Efeitos dos inibidores de histonas desacetilase sobre enzimas epigenéticas no cérebro de animais submetidos a modelos de mania e de depressão / Roger Bitencourt Varela. – 2018.
100 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.
Orientação: Samira Valvassori.
Coorientação: João Luciano de Quevedo.

1. Transtorno bipolar. 2. Psicoses. 3. Depressão. 4. Transtorno depressivo maior. 5. Epigenética. 6. inibidores de histonas desacetilase. 7. Butirato de Sódio. I. Título.

CDD 23. ed. 616.895

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



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 **Roger Bitencourt Varela** sob o título “**EFEITOS DOS INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASE SOBRE ENZIMAS EPIGENÉTICAS NO CÉREBRO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELOS DE MANIA E DE DEPRESSÃO**”, 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.

Criciúma, SC, 07 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA JOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo – UNESC

Profa. Dra. MARIA LUIZA SARAIVA PEREIRA
Membro Externo – UFRGS

Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto PPGCS

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

Dedico essa tese de doutorado à minha família e amigos, por toda força, confiança e os mais puros sentimentos que depositaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Não posso começar com outro agradecimento se não à minha família. Meus pais, **Claudionor** e **Fátima**, que sempre foram os maiores entusiastas da minha jornada. Sempre pude contar com seu apoio e incentivo para o meu crescimento e realização, mesmo que para isso tivessem que ir contra seus próprios desejos algumas vezes. Entenderam e aceitaram minha distância, e continuam me apoiando para ir ainda mais longe. Sei que nunca serei capaz de retribuir de igual forma todo incentivo que recebi, mas todas as minhas conquistas são e serão de vocês também. Aos meus irmãos **Richard** e **Renan**, que sempre estiveram do meu lado para qualquer coisa que precisasse. Saibam que seu apoio sempre foi fundamental, e eu sempre serei muito grato por isso.

Às pessoas especiais que compartilharam comigo toda essa etapa da minha vida, **Luiz Felipe**, **Fernanda**, **Gustavo**, **Samira**, **Zé**, **Alexandra**, **Helena**, **Daniela**, **Wilson** e **Amanda**. Vocês sempre fizeram eu acreditar mais em mim mesmo e isso foi fundamental, meu muito obrigado. Vocês são pessoas incríveis, e tenho certeza do sucesso na vida de cada um de vocês. Tenho o prazer e a honra de ter pessoas maravilhosas como vocês em minha vida. Os laços que criamos irão permanecer para sempre, e eu sempre levarei vocês comigo.

Ao **Laboratório de Psiquiatria Translacional** por abrir as portas para que eu pudesse começar a trabalhar com pesquisa, e conseguisse viver todas as experiências e conquistas que alcancei nesses 10 anos. Aos **colegas** de laboratório, em especial ao grupo de pesquisa da professora **Gislaine Réus** pela parceria nos experimentos da minha tese.

A todos os **professores do doutorado**, ao professor **João Quevedo** meu coorientador, e a professora **Susannah Tye** minha coorientadora do doutorado sanduíche. Agradeço por todo o conhecimento que me passaram e por todas as oportunidades que me ofereceram. Serão sempre referência de profissionais que irei levar para minha carreira.

Agradeço especialmente à **Samira Valvassori**, minha orientadora, amiga, irmã e as vezes quase mãe. Esses agradecimentos não são apenas pelo doutorado, mas são também pelos quase 10 anos de amizade e companheirismo. Durante todo esse tempo você nunca mediu esforços para me ajudar em qualquer situação, sem a sua ajuda, tenho certeza que não teria chegado tão longe. Você sempre será o principal modelo a seguir na vida e eu serei eternamente grato pela oportunidade de ter você como maior incentivadora da minha carreira. É uma honra poder ser seu primeiro aluno de doutorado, espero um dia poder retribuir tudo isso e farei o possível honrar seus ensinamentos durante toda minha carreira.

Meus agradecimentos à **UNESC** por me fornecer as melhores oportunidades para aprimorar meu conhecimento durante a graduação mestrado e doutorado. Agradeço também à **CAPES** pelo apoio financeiro e oportunidade de crescimento pessoal e acadêmico que tive durante o doutorado. Por fim, agradeço a todos que ajudaram direta ou indiretamente na minha formação e contribuíram para o meu crescimento.

Meu muito obrigado!

*“Assim, quando vocês souberem qual é
exatamente a pergunta, vocês saberão
o que significa a resposta”*

DOUGLAS ADAMS

RESUMO

Introdução: Os transtornos neuropsiquiátricos são responsáveis por 13% da carga global de doenças. Dentre os mais impactantes estão o transtorno bipolar (TB) e o transtorno depressivo maior (TDM). Os transtornos de humor possuem uma etiologia multifatorial, onde a interação dos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos e são responsáveis pelo desenvolvimento dos mesmos. A epigenética compreende alterações moleculares que modificam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA propriamente dito. Por serem moduladas pelas alterações do meio, a epigenética é denominada a “ponte” entre gene e ambiente. Diversos estudos têm sugerido o envolvimento das alterações epigenéticas na fisiopatologia e tratamento dos transtornos do humor. Os inibidores de histona desacetilase (HDAC) parecem exercer efeitos antimaniacos e antidepressivos em estudos pré-clínicos; entretanto, seus mecanismos de ação permanecem desconhecidos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos dos inibidores de histonas desacetilase sobre alterações epigenéticas em cérebro de ratos submetidos a modelos animais de mania e de depressão. **Métodos:** Para avaliar os efeitos antimaniacos, camundongos C57Bl/6 machos adultos foram submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP) e ratos Wistar machos foram submetidos aos modelos animais de mania induzidos por anfetamina (amph) ou ouabaína (OUA). Os animais foram tratados durante sete dias com injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de butirato de sódio (BS) ou valproato (VPA). Após o tratamento, a atividade locomotora dos animais foi avaliada pelo teste de campo aberto. Para avaliar os efeitos antidepressivos, ratos Wistar foram submetidos aos modelos de depressão induzidos por privação materna (PM) ou estresse crônico moderado (ECM). Os animais foram tratados durante sete dias com injeções i.p. de BS, e, após o tratamento, foram submetidos ao teste de nado forçado. As atividades de HDAC, histona acetiltransferase (HAT) e DNA metiltransferase (DNMT) foram avaliadas através de ELISA no córtex frontal, hipocampo e estriado dos animais submetidos aos modelos de mania e de depressão. **Resultados:** OUA, amph, e PSP induziram hiperatividade, que é considerado um comportamento do tipo maniaco. Os modelos de amph e PSP, mas não OUA, aumentaram a atividade de HDAC e DNMT. O tratamento com inibidores de HDAC reverteu o comportamento do tipo maniaco e diminuiu a atividade dessas duas enzimas nos três modelos. Ambos modelos de depressão induziram comportamento do tipo depressivo, que foi acompanhado do aumento da atividade de HDAC e DNMT. O tratamento com BS diminuiu o comportamento do tipo depressivo e a atividade de HDAC e DNMT no cérebro dos animais. As atividades de HDAC e DNMT foram positivamente correlacionadas entre elas e com os comportamentos do tipo maniaco e do tipo depressivo em todos os modelos. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que, embora os mecanismos epigenéticos possam não estar relacionados com a indução dos comportamentos maniaco e depressivo, sua modulação parece exercer efeitos terapêuticos em ambos os casos. O BS exerce um efeito cruzado sobre as enzimas epigenéticas, modulando a atividade de DNMT, através da inibição de HDAC.

Palavras Chave: Transtorno bipolar; Mania; Depressão; Epigenética; Butirato de Sódio.

ABSTRACT

Background: Neuropsychiatry disorders account for 13% of global illness burden and, among the most impactful are bipolar disorder (BD) and major depressive disorder (MDD). Mood disorders have a multifactorial etiology, which involves the interaction between genetic and environmental factors in its development. Epigenetics is defined by molecular alterations that modify gene expression without changing DNA sequence by itself. Since environmental factors modulate these alterations, epigenetic is denominated the “bridge” between gene and environment. Several studies have suggested the role of epigenetic alterations on mood disorders pathophysiology and treatment. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors seem to have an antimanic and antidepressant effect in preclinical studies; however, its mechanisms of action are still unknown. **Objective:** Evaluate the effects of HDAC inhibitors on epigenetic alterations in the brain of rats submitted to animal models of mania and depression. **Methods:** To evaluate antimanic effects, adult male mice were submitted to the animal model of mania induced by paradoxical sleep deprivation (PSP) and, male Wistar rats were submitted to the animal model of mania induced by Amphetamine (amph) or Ouabain (OUA). The animals were treated during seven days with daily intraperitoneal (i.p.) injections of Sodium Butyrate (BS) or Valproate (VPA). At the end of the treatment, animals locomotor activity was evaluated by the open-field test. To evaluate the antidepressant effects, male Wistar rats were submitted to the animal models of depression induced by maternal deprivation (MD) or chronic mild stress (CMS). The animals were treated during seven days with daily injections of BS and, at the end of the treatment, were submitted to the forced swimming test. HDAC, Histone Acetyltransferase (HAT) and DNA methyltransferase (DNMT) activities were evaluated, by ELISA, in brains frontal cortex, hippocampus, and striatum of animals submitted to each animal model of mania or depression. **Results:** OUA, amph, and PSP induced hyperactivity in rats, which is considered manic-like behaviors. Amph and PSP, but not OUA, increased HDAC and DNMT activity in the brain. HDAC inhibitors treatment reversed the manic-like behavior and decreased both enzyme activities in all of the three mania models. Both depression animal models induced depressive-like behavior in rats, and it was accompanied by increased HDAC and DNMT activities. SB treatment decreased depressive-like and manic-like behaviors and HDAC and DNMT activities in the brain of the rats. HDAC and DNMT activities were positively correlated between themselves and with the manic- and depressive-like behaviors in all the animal models. **Conclusion:** These results suggest that, although the epigenetic mechanisms may not be related to the induction of manic- and depressive-like behavior, its modulation seems to have therapeutic effects in both of the cases. BS exercise a cross effect on epigenetic enzymes, modulating DNMT activity through HDAC inhibition.

Keywords: Bipolar disorder, Mania, Depression, Epigenetics; Sodium Butyrate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Funções específicas dos tipos de DNMT	22
Figura 2: Representação do nucleossomo.....	23
Figura 3: Representação da atividade de HAT e HDAC.....	24
Figura 4: Protocolo do modelo animal de mania induzido por d-amph.....	34
Figura 5: Protocolo do modelo animal de mania induzido por PSP.....	35
Figura 6: Protocolo do modelo animal de mania induzido por OUA	36
Figura 7: Protocolo do modelo animal de depressão induzido por PM	37
Figura 8: Protocolo do modelo animal de depressão induzido por ECM	38
Figura 9: Parâmetros de cruzamento e levantamento no campo aberto	39
Figura 10: Parâmetros de imobilidade, natação e escalada no teste de nado forçado	39
Figura 11: Procedimento das análises de atividade de HDAC, DNMT e HAT	42
Figura 12: Efeitos do VPA e BS sobre o teste de campo aberto de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-amph.....	45
Figura 13: Efeitos do VPA e BS sobre a atividade de HDAC no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-amph.....	46
Figura 14: Efeitos do VPA e BS sobre a atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-amph.....	46
Figura 15: Efeitos do VPA e BS sobre a atividade de HAT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-amph.....	46
Figura 16: Correlação entre o número de cruzamentos vs. atividade de HDAC e DNMT; atividade de HDAC vs atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por d-amph.....	48
Figura 17: Efeitos do VPA e BS sobre o teste de campo aberto de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por PSP	49
Figura 18: Efeitos do VPA e BS sobre a atividade de HDAC no cérebro de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por PSP	50
Figura 19: Efeitos do VPA e BS sobre a atividade de DNMT no cérebro de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por PSP	50
Figura 20: Efeitos do VPA e do BS sobre a atividade de HAT no cérebro de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por PSP	50
Figura 21: Correlação entre o número de cruzamentos vs atividade de HDAC e DNMT; atividade de HDAC vs atividade de DNMT no cérebro de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido PSP.....	51
Figura 22: Efeitos do VPA e BS sobre o teste de campo aberto de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.....	52
Figura 23: Efeitos do VPA e do BS sobre a atividade de HDAC no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.....	53
Figura 24: Efeitos do VPA e do BS sobre a atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.....	53
Figura 25: Efeitos do VPA BS sobre a atividade de HAT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.....	53
Figura 26: Correlação entre o número de cruzamentos vs atividade de HDAC e DNMT; atividade de HDAC vs atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA.....	54

Figura 27: Efeitos BS sobre o teste de nado forçado de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM.....	55
Figura 28: Efeitos do BS sobre a atividade de HDAC no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM	56
Figura 29: Efeitos do BS sobre a atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM	56
Figura 30: Efeitos do BS sobre a atividade de HAT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM	56
Figura 31: Correlação entre o tempo de imobilidade vs atividade HDAC e DNMT); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM	58
Figura 32: Efeitos do BS sobre o teste de nado forçado de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM.....	59
Figura 33: Efeitos do BS sobre a atividade de HDA) no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM.....	60
Figura 34: Efeitos do BS sobre a atividade de DNM) no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM.....	60
Figura 35: Efeitos do BS sobre a atividade de HAT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM.....	60
Figura 36: Correlação entre o tempo de imobilidade vs atividade de HDAC e DNMT; atividade de HDAC vs atividade de DNMT no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas HAT	25
Tabela 2: Classificação das enzimas HDAC.....	26
Tabela 3: Compilação dos resultados de atividade enzimática.	62
Tabela 4: Compilação dos resultados da força de correlação	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5fC – 5-formilcitosina
5hmC – 5-hidroximetilcitosina
5mC – 5 metilcitosina
aCSF – Líquor artificial
ADP – Adenosina difosfato
AKAP – Proteína de ancoragem a quinase A
Amph – Anfetamina
ANOVA – Análise de variância
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
BS – Butirado de sódio
CBP – Proteína de ancoragem da CREB
CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais
DNMT – DNA metiltransferase
DPN – Dia pós-natal
DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DTT – Ditioteitol
ECM – Estresse crônico moderado
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GAD1 – Glutamato descarboxilase 1
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia
H – Histona
HAT – Histona acetiltransferase
HDAC – Histona desacetilase
hDAT – Transportador de dopamina humano
HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal
i.p. – Intraperitoneal
ICV – Intracerebroventricular
K – Lisina
Li – Lítio
mRNA – RNA mensageiro
NAD - Nicotinamida e adenina dinucleotídeo
NGF – Fator neurotrófico derivado do nervo
OUA – Ouabaína
PKC – Proteína quinase C
PM – Privação materna
PSD-95 – Proteína de densidade pós-sináptica 95
PSP – Privação do sono paradoxal
Sal – Solução salina
SAM – S-adenosilmetionina
SBNcC – Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento
TB – Transtorno Bipolar
TDG – Timina DNA glicosilase
TDM – Transtorno Depressivo Maior
TET – Proteína de translocação *ten-eleven*
TrkB - Receptor de tropomiosina quinase B
VPA – Valproato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR	17
1.2 EPIGENÉTICA E TRANSTORNOS DE HUMOR	20
1.3 FARMACOTERAPIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR.....	26
1.4 MODELOS ANIMAIS DE MANIA E DEPRESSÃO	28
1.5 JUSTIFICATIVA	31
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	33
3.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS	33
3.2.1 Modelo animal de mania induzido por dextroanfetamina	33
3.2.2 Modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal	34
3.2.3 Modelo animal de mania induzido por ouabaína	35
3.2.4 Modelo animal de depressão induzido por privação materna	36
3.2.5 Modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado	37
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	38
3.3.1 Teste do campo aberto	38
3.3.2 Teste de nado forçado	38
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	39
3.4.1 Preparação dos extratos nucleares	40
3.4.2 Avaliação da atividade de Histona Desacetilases	40
3.4.3 Avaliação da atividade de DNA Metiltransferases	42
3.4.4 Avaliação da atividade de Histona Acetiltransferase	43
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	45
4.1 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR DEXTRO-ANFETAMINA	45
4.2 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL	48
4.3 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAINA.....	52

4.4 MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR PRIVAÇÃO MATERNA.....	55
4.5 MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO	58
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	77
7 LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A.....	97
ANEXO B.....	99

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos neuropsiquiátricos, que incluem distúrbios neurológicos e psiquiátricos, são responsáveis por 13% da carga global de doenças (Lund et al., 2012). Pessoas com transtornos mentais possuem um índice de mortalidade 2,22 vezes maior que a população em geral, totalizando cerca de 8 milhões de mortes por ano. Dentre os transtornos mais impactantes pode-se citar a esquizofrenia, a ansiedade, o transtorno depressivo maior e o transtorno bipolar (TB) (Walker et al., 2015).

Durante muito tempo, o TB e os transtornos depressivos foram classificados como transtornos do humor, ocupando o mesmo capítulo no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM – do inglês *Diagnostic and Statistic Manual*). Entretanto, na última versão do DSM, publicada no ano de 2014, o TB ganhou um capítulo exclusivo, tendo em vista que os episódios maníacos são o marco clínico desse transtorno (*American Psychiatric Association*, 2014). Alguns autores descrevem que o TB compartilha características tanto com os transtornos depressivos quanto com a esquizofrenia, e juntos esses três formam uma espécie de espectro de transtornos psiquiátricos e não três transtornos completamente distintos (Kato, 2015). Apesar de não estarem mais incluídos na sessão de transtornos de humor do DSM-V, esse termo ainda é utilizado para descrever o TB e os transtornos depressivos (Jorge, 2015).

O TB é um transtorno psiquiátrico crônico, grave, altamente incapacitante e é o terceiro transtorno psiquiátrico com maior impacto na qualidade de vida dos pacientes (Subramaniam et al., 2013). Estima-se que, atualmente, esse transtorno acomete cerca de 2% a 2,5% da população mundial. Porém, esse número pode ser maior, uma vez que os critérios de diagnóstico podem variar entre os países e muitos casos podem ser confundidos com outros transtornos psiquiátricos, como a depressão, a esquizofrenia e o abuso de substâncias (Fajutrao et al., 2009; Clemente et al., 2015; Rowland e Marwaha, 2018). O termo bipolar expressa os dois polos de humor que se intercalam, sendo eles os episódios depressivos e maníacos ou hipomaníacos. Atualmente, o TB é dividido em tipo I, tipo II, ciclotímico e transtornos relacionados, dependendo da duração e intensidade dos episódios. Um episódio maníaco clássico é caracterizado pela presença de, no mínimo, cinco dos seguintes sintomas por um período de 7 dias: humor expansivo ou irritável, auto-estima inflada ou grandiosidade, redução da necessidade do sono, fuga de ideias,

distrabilidade, agitação psicomotora, aumento da atividade sexual e comportamento de risco. Já um episódio depressivo é caracterizado pela presença de no mínimo cinco dos seguintes sintomas por um período maior que 15 dias: humor deprimido, perda de interesse ou prazer, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, retardo psicomotor, fadiga, perda de energia, diminuição da concentração, indecisão e pensamento recorrente de morte (American Psychiatric Association, 2014).

Dentro dos transtornos depressivos, o transtorno depressivo maior (TDM) possui uma prevalência global de aproximadamente 5% (Ferrari et al., 2013), podendo variar de 2% a 8% dependendo da influência cultural do país (Kessler e Bromet, 2013). O TDM é uma das principais causas de invalidez no mundo e vem crescendo ao longo dos anos, estimando-se alcançar o *status* de segunda maior causa de invalidez em 2020 (Murray e Lopez, 1996; Üstün et al. 2004). Considerado um problema de saúde pública, estima-se que os custos econômicos do TDM nos Estados Unidos foram de 210,5 bilhões de dólares no ano de 2010, entre custos diretos, relacionados ao suicídio e relacionados a invalidez (Greenberg et al., 2015).

O TDM representa a condição clássica do grupo de transtornos depressivos, caracterizado por episódios de pelo menos duas semanas de duração, podendo durar até dois anos, em que o paciente apresente humor deprimido na maior parte do dia, perda de prazer ou interesse, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga, sentimento de inutilidade ou culpa, dificuldade no raciocínio e concentração, pensamento de morte e, em alguns casos, ideação e tentativa de suicídio. O diagnóstico pode ser baseado em um único episódio, embora a recorrência dos mesmos seja muito frequente (American Psychiatric Association, 2014).

O TB e o TDM acarretam graves consequências para os pacientes, os familiares e a população em geral; entretanto, apesar da gravidade e do avanço nos estudos, não se conhece a precisa neurobiologia dos transtornos de humor.

1.1 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR

Baseando-se na hereditariedade dos transtornos de humor, é evidente que os mesmos possuem uma base genética; entretanto, estudos genéticos ainda não conseguiram encontrar genes específicos para cada transtorno. Além disso, eventos estressores durante as diferentes fases do desenvolvimento dos pacientes possuem

uma importante carga para a prevalência desses transtornos (Klengel e Binder, 2015). Sendo assim, os transtornos de humor possuem uma etiologia multifatorial, onde a interação dos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos e são responsáveis pelo desenvolvimento dos mesmos (Nestler et al., 2016).

Já é amplamente descrito na literatura que diversas influências genéticas e ambientais podem agir como fatores de risco para o desenvolvimento do TB (Rowland e Marwaha, 2018). As influências ambientais podem ser de vários tipos e, dentre elas, pode ser citado: as infecções perinatais e as complicações obstétricas (Scott et al., 2006; Barichello et al., 2016), os traumas durante a infância, que podem incluir abuso, violência e negligência física e emocional (Agnew Blais e Danese, 2016; Palmier-Claus et al., 2016), os estresses psicológicos durante a vida adulta (Lex et al., 2017) e uso de substância, especialmente *Cannabis* (Gibbs et al., 2015; Marwaha et al., 2017). Além disso, diversas alterações genéticas parecem agir como pré-dispositoras do TB, incluindo polimorfismos no gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*) (Fan e Sklar et al., 2008; Aas et al., 2014) e do transportador de serotonina (Cho et al., 2005; De-Pradier et al., 2010). Da mesma forma, existem diversos fatores ambientais e genéticos que predis põem o TDM, dentre eles a falta de nutrientes e o consumo exagerado de gorduras, doces e *fast-foods* (Sanchez-Villegas et al., 2012), os distúrbios do sono (Baglioni et al., 2011), o sedentarismo (Teychenne et al., 2010), os problemas econômicos e de relacionamento (Wu et al., 2017), os traumas durante a infância (Dias-de-Mattos-Souza et al., 2016; Scheuer et al., 2018), bem como polimorfismos nos genes de BDNF (Jiang et al., 2013), do transportador de serotonina (Taylor et al., 2017) e encurtamento acelerado dos telômeros (Palmos et al., 2018). Juntos esses resultados sugerem que a interação do gene com o ambiente é o gatilho para as alterações fisiopatológicas e desenvolvimento dos transtornos do humor.

O diagnóstico dos transtornos de humor ainda é realizado exclusivamente pela avaliação dos sintomas e, apesar do grande avanço tecnológico e nas pesquisas, ainda não existe nenhum marcador biológico específico para esses transtornos, evidenciando a necessidade de mais estudos sobre suas bases biológicas (Grande et al., 2015; Wager e Woo, 2017). Embora o TB e o TDM possuam um fenótipo bastante distinto, sua neurobiologia, ainda que pouco conhecida, parece ter várias características em comum (Tang et al., 2018). Diversas teorias sobre a fisiopatologia

desses transtornos têm sido propostas por diferentes autores ao longo dos anos, como a teoria da disfunção monoaminérgica (Veselinovic et al., 2013; de Bartolomeis et al., 2014; Jun et al., 2014; Dobożewska et al., 2017; Ramirez et al., 2018), da alteração do metabolismo energético (Calally et al., 2015; MacDonald et al., 2018), do estresse oxidativo (Brown et al., 2014; Liu et al., 2015) e do sistema inflamatório (Anderson e Maes, 2015; Galecki et al., 2018).

Estudos *postmortem* e de neuroimagem demonstram que o sistema límbico é o sistema mais afetado no cérebro de pacientes bipolares e depressivos (Bielau et al., 2013; Jiang et al., 2017). O sistema límbico é um sistema de estruturas cerebrais centrais e corticais interconectadas, responsável pela modulação dos processos de humor, emoção e memória (Patestas e Gartner, 2006). Nieuwenhuys (1996) foi quem primeiro descreveu esse sistema e dentre as estruturas que o compõem pode-se citar o córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e amígdala.

O córtex pré-frontal é uma região cortical que durante muito tempo pensou-se ser funcionalmente insignificante. Entretanto, após o desenvolvimento de tecnologias de neuroimagem e neurofisiologia, descobriu-se que essa estrutura desempenha um papel importante no controle do humor, na cognição, na organização e no comportamento social (Millan et al., 2016). Essa estrutura cerebral recebe inervações monoaminérgicas e colinérgicas, e envia projeções (na maioria glutamatérgica) para quase todas as regiões corticais e centrais, o que coloca o córtex pré-frontal em uma posição única, orquestrando uma série de funções neurais cognitivas e efetivas (Szczepanski e Knight, 2014). O hipocampo possui papel fundamental nos processos de aquisição, consolidação e recuperação de memórias declarativas. Entretanto, apesar de desempenhar tal função na formação de memória, o processamento de estímulos externos e armazenamento da memória consolidada ocorre nas regiões corticais do cérebro. Por esse motivo, o hipocampo possui diversas ligações com regiões corticais, incluindo o córtex pré-frontal. Juntas essas estruturas formam um subsistema denominado córtico-hipocampal, responsável pelo processamento das informações e estímulos recebidos para posterior formação de memória e armazenamento (Eichenbaum, 2000). O estriado, por sua vez, possui um papel importante no controle de seleção de ações baseadas no aprendizado de ação-resultado, particularmente quando as ações disponíveis estão vinculadas a resultados recompensadores. Por isso, essa estrutura está bastante relacionada com o controle da impulsividade, comportamentos motivados e

sistema de recompensa (Kim e Im et al., 2018). O estriado é conhecido com um dos mais importantes centros dopaminérgicos do cérebro, recebendo uma grande quantidade de projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (especialmente para as regiões dorso-lateral e núcleo *accumbens*) (Eban-Rothschild et al., 2016). Além dessas conexões, o estriado possui projeções bilaterais com o córtex pré-frontal, essa via córtico-estriatal permite que os processos de atenção espacial, mediados pelo pré-frontal, contribuam para a integração da seleção de recompensa e respostas (Jarbo e Verstynen, 2015).

Tendo em vista a importância do sistema límbico nos principais domínios comportamentais afetados nos transtornos de humor, e que essas alterações têm origem na interação ambiente-gene, os mediadores biológicos dessa interação têm sido sugeridos como peça chave para a fisiopatologia dos transtornos de humor (Ludwig e Dwivedi, 2016; Hoffman et al., 2017).

1.2 EPIGENÉTICA E TRANSTORNOS DE HUMOR

A epigenética compreende alterações moleculares que modificam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA propriamente dita. Por serem moduladas pelas alterações do meio, a epigenética é denominada a “ponte” entre gene e ambiente (Klengel e Binder, 2015). Por esse motivo, essas alterações têm sido amplamente estudadas nos transtornos psiquiátricos (Ludwig e Dwivedi, 2016; Hoffman et al., 2017).

As alterações epigenéticas podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de modulação e alvos moleculares, sendo pré- ou pós-transcricionais. As alterações pré-transcricionais ocorrem diretamente no DNA, impedindo o início da transcrição. Por sua vez, as alterações pós-transcricionais inibem a transcrição gênica através de alterações moleculares no RNA mensageiro (mRNA) e nas proteínas. A principal alteração pré-transcricional é a metilação do DNA, enquanto as pós-transcricionais são os micro-RNAs e as alterações de histonas (Portela e Esteller, 2010).

A metilação do DNA foi o primeiro mecanismo epigenético descrito (Holliday e Pugh, 1975; Riggs, 1975), embora na época ainda não se soubesse sobre suas funções na modulação da transcrição gênica. Essa alteração epigenética consiste na ligação de um grupamento metil no carbono 5 de uma citosina que é seguida por

uma guanina, sequência denominada de CpG, em que o 'C' representa a citosina, 'p' representa o grupamento fosfato da ligação entre as bases nitrogenadas e 'G' representa a guanina. A citosina metilada é denominada 5-metilcitosina (5mC) (Moore et al., 2013). O mecanismo básico pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição é através da criação de uma barreira física, impedindo o ancoramento de fatores de transcrição e da RNA polimerase. Tendo em vista que a região promotora dos genes são regiões ricas em CpG, denominadas ilhas CpG, essas são as áreas mais comumente metiladas, impedindo que a transcrição se inicie (Feng et al., 2018). Vale ressaltar que esse não é o único mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe transcrição, estudos demonstram que regiões metiladas do DNA podem atrair enzimas que alteram a conformidade de histonas, mecanismos que serão discutidos posteriormente (Irvine et al., 2002).

A metilação do DNA nem sempre está relacionada com repressão gênica. Embora as ilhas CpG sejam mais frequentes na região promotora do gene, as mesmas podem ocorrer na região do corpo do gene. Nesses casos, essas ilhas facilitam o ancoramento de mecanismos de transcrição em lugares inadequados e a consequente transcrição de fragmentos incompletos de mRNA, que não irão codificar proteínas, podem inibir a atividade de mRNAs funcionais no citoplasma (Saliminejad et al., 2018). Sendo assim, embora a metilação de DNA esteja relacionada a repressão gênica de forma geral, essa atividade pode variar de acordo com a região em que a metilação acontece (Maunakea et al., 2013).

As enzimas DNA metiltransferases (DNMT) são responsáveis por transferir um grupamento metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o CpG do DNA. Em seres humanos existem três tipos dessa enzima, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (Luczak e Jagodzinski, 2006). A DNMT1 é conhecida como metiltransferase de manutenção, uma vez que está envolvida no processo de replicação do DNA e copia as marcas de metilação da fita molde original. As enzimas DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela metilação *de-novo*, criando novos padrões de metilação no DNA de acordo com estímulos externos (Jeltsch e Jurkowska, 2014). A figura 1 representa as diferentes funções da DNMT nos processos de metilação.

As marcas epigenéticas de metilação do DNA são as mais estáveis, sendo dificilmente revertidas; entretanto, a desmetilação de DNA pode acontecer tanto de forma passiva quanto de forma ativa (Bochtler et al., 2017). A forma passiva de desmetilação compreende uma inatividade da DNMT1; assim, após sucessivas

replicações de DNA, as marcas epigenéticas não são restabelecidas nas fitas novas, se perdendo ao longo das divisões celulares (Kagiwada et al., 2013). O processo de desmetilação ativa envolve duas etapas, a primeira etapa é mediada pela enzima de translocação *ten-eleven* (TET – do inglês *ten-eleven translocation*), onde a 5mC é convertida em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e 5-formilcitosina (5fC), seguida pela atividade da enzima timina DNA glicosilase (TDG), que retira essa base nitrogenada, seguida pela translocação de uma citosina através do mecanismo de reparo de excisão de bases (Schuermann et al., 2016).

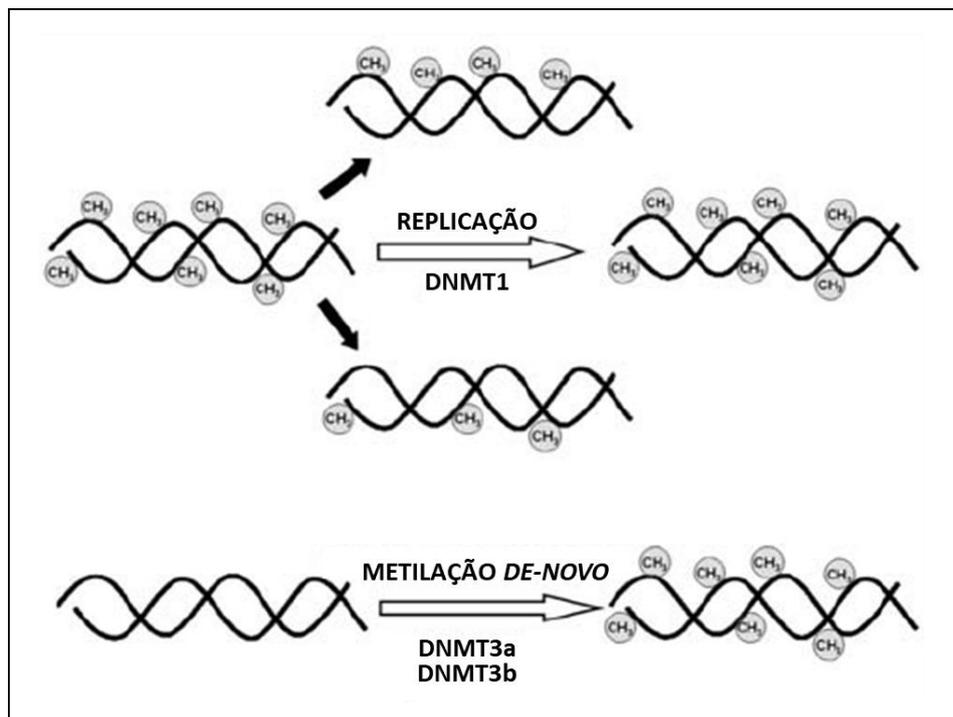


Figura 1: Representação das funções específicas dos tipos de DNMT. A DNMT1 é responsável por manter os padrões de metilação após a replicação. A enzima DNMT3a e DNMT3b é responsável por criar novos padrões de metilação do DNA. Fonte: Adaptado de Luczak e Jagodzinski, 2006

A estrutura básica da cromatina, o nucleossomo, consiste em uma sequência de DNA de aproximadamente 147 pb, envolto em um octâmero de histonas, que inclui duas moléculas de cada subtipo de histona H2A, H2B, H3 e H4 (Kouzarides, 2007). Por fim, um tipo de histona conhecida como histona ligadora, H1, liga-se ao octâmero pelo lado externo ao nucleossomo, estabilizando a estrutura da cromatina (Allan et al., 1980), como mostrado na figura 2. Além dessa estrutura básica, as histonas possuem prolongamentos proteicos denominados “caudas”, formados por sequências de aminoácidos que apresentam extremidades amino-terminais. O DNA possui carga negativa enquanto as caudas da histona possuem carga positiva, o que proporciona a aderência do DNA às histonas (Zhang et al., 2015).

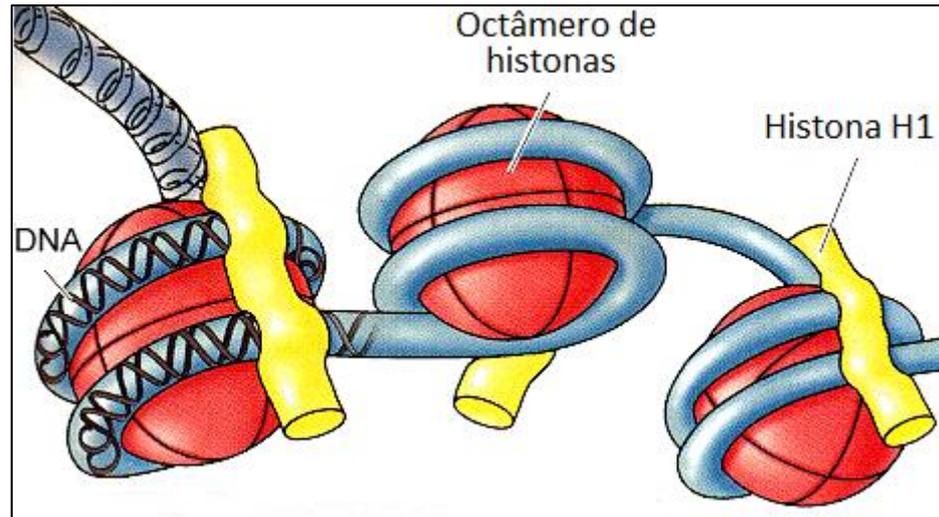


Figura 2: Representação do nucleossomo. Na imagem, as esferas vermelhas representam o octâmero de histonas formados por duas unidades de H2A, de H2B, de H3 e de H4. Esse octâmero encontra-se envolto pela fita de DNA. A histona H1, representada em amarelo na figura, se liga pelo lado externo do nucleossomo. Fonte: Adaptado de Purves et al., 1997.

As caudas das histonas podem se ligar a diferentes grupamentos químicos que alteram sua carga elétrica e por sua vez modulam a atração DNA-histona e histona-histona, exercendo efeitos específicos sobre sua conformação. Existem mais de cem tipos diferentes de modificações de histonas como, metilação, fosforilação, acetilação, ubiquitinação, sumoilação, nitrilação, glicosilação entre outras (Zhang et al., 2015).

O presente estudo foca-se focar em uma alteração de histonas denominada acetilação. Nessa alteração, os grupamentos acetil provenientes de um aminoácido ϵ -N-acetil-lisina se liga aos resíduos de lisina (K) da cauda das histonas (Kouzarides, 2007; Le et al., 2014). Quando a histona é acetilada sua carga positiva é atenuada, diminuindo a atração DNA-histona. Isso leva a uma cromatina mais relaxada, facilitando a ligação de fatores de transcrição nas regiões promotoras do gene e, conseqüentemente, maior transcrição de proteínas. Por outro lado, na desacetilação das histonas a atração DNA-histona aumenta, fazendo com que a cromatina fique mais condensada, dificultando a ligação de fatores de transcrição e diminuindo a transcrição de proteínas (Bannister e Kouzarides, 2011; Zentner e Henikoff, 2013; Mitrousis et al., 2015). O processo de acetilação de histonas é mediado por uma classe de enzimas denominadas histona acetiltransferase (HAT) enquanto o processo de desacetilação de histona é mediado pela enzima histona desacetilase (HDAC) (Bannister e Kouzarides, 2011), de acordo com a figura 3.

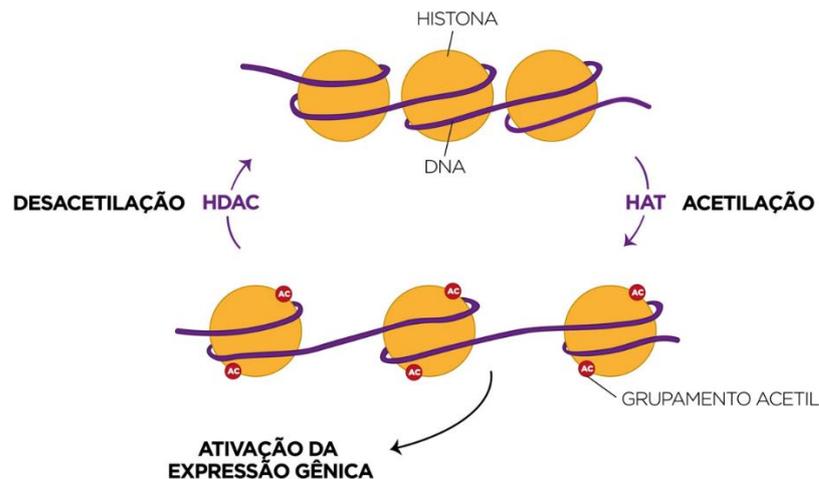


Figura 3: Representação da atividade de HAT e HDAC. A HAT é responsável por catalisar a ligação de um grupamento acetil nas histonas tornando a cromatina mais relaxada, enquanto a HDAC é responsável por mediar a desacetilação das histonas, tornando a cromatina mais densa. Fonte: Do autor.

Existem aproximadamente 25 tipos diferentes de enzimas HAT, classificadas de acordo com suas sequências homólogas em 7 famílias distintas: citoplasmática, GNAT, p300/CBP, MYST, Rtt109, coativadores transcricionais e coativadores de receptores esteroides (Luan et al., 2015; Wapenaar et al., 2016). A classificação das enzimas HAT está demonstrada na tabela 1. As enzimas HDAC, por sua vez, são classificadas dentro de duas famílias e 4 classes (classes I, II, III e IV) de acordo com seu domínio desacetilase. As classes I, II e IV são conhecidas como HDACs clássicas, enquanto a classe III, que compreende a classes de proteínas denominadas sirtuínas, que se diferem das clássicas por seus domínios protéicos serem dependentes de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD do inglês - *Nicotinamide adenine dinucleotide*) e adenosina difosfato (ADP) (Seto e Yoshida, 2014). A classificação das HDACs está demonstrada na tabela 2.

Esses mecanismos epigenéticos são responsáveis pela modulação de diversas funções fisiológicas vitais no organismo como: diferenciação, proliferação, divisão celular, inativação do cromossomo X, desenvolvimento embrionário e envelhecimento (Choudhuri, 2011; Cotton et al., 2015; Xu e Xie, 2018; Unnikrishnan et al., 2018). Entretanto, a desregulação das alterações epigenéticas parece estar envolvida na fisiopatologia de diversas doenças, inclusive transtornos psiquiátricos (Klengel et al., 2015).

De fato, em uma revisão de literatura Peedicayil (2014) compilou alguns estudos demonstrando que alterações na conformação das histonas parecem estar ligadas

ao TB. Um estudo *postmortem*, com cérebro de pacientes bipolares, demonstrou uma maior acetilação de histonas nas regiões promotoras de genes relacionados a esquizofrenia, como: glutamato descarboxilase 1 (GAD1), receptor 2C de 5-hidroxitriptamina, homólogo A da proteína translocase da membrana mitocondrial externa 70 e da proteína fosfatase-1E (Tang et al, 2011). Do mesmo modo, outro estudo mostrou uma desregulação na expressão do gene GABRB2, subunidade B2 do receptor de GABA, mediada pela atividade de HDAC2 (Zhao et al., 2012). Estudos com amostras de tecidos periféricos também mostraram alterações, como aumento de acetilação de H3 em pacientes bipolares comparados com esquizofrênicos (Gavin et al., 2009) e aumento da expressão de HDAC4, HDAC6 e HDAC8 em bipolares comparados com controle (Hobara et al., 2010).

Tabela 1: Classificação das enzimas HAT. Fonte: adaptado de Luan et al., 2015; Wapenaar et al; 2016

Família	Membros	Substratos específicos
Citoplasmática	HAT1/KAT1 HAT4/NAA60	H4(K5,K12), H2A(K5) Não descrito
GNAT	Gen5/KAT2A PCAF/KAT2B yHpa2/KAT10 yHpa3 Elp3/KAT9	H2B(K16), H3(K14,K18,K23) H3(K14) H3(K4,K14), H4(K5,K12,K8) H4(K8,K5,K12) H3(K14), H4(K8)
p300/CBP	CBP/KAT3A p300/KAT3B	H2A(K5), H2B(K12,K15), H3(K14,K18,K23), H4(K5,K8,K12,K16) H2A(K5), H2B(K12,K15), H3(K14,K18,K23), H4(K5,K8,K12,K16)
MYST	Tip60/KAT5 MOZ/MYST3/KAT6A MORF/MYST4/KAT6B HBO1/MYST2/KAT7 MOF/MYST1/KAT8 yEsa1 (KAT5) ySas2 (KAT8) ySas3 (KAT6)	H2A(K5), H3(K14), H4(K5,K8,K12,K16) H3, H4 H2A, H3, H4 H4 H4(K16) H2A, H4 H4(K16) H3(K14)
Rtt109	yRtt109 (KAT11)	H3(K56)
Coativadores transcripcionais	TAF1/TBP/KAT4 TIFIIC90/ KAT12	Não descrito Não descrito
Coativadores de receptores esteroides	SRC1/KAT13A SCR3/AIB1/ACTR/KAT13B p600/KAT13C CLOCK/KAT13D	Não descrito Não descrito Não descrito Não descrito

Tabela 2: Classificação das enzimas HDAC. Fonte: Adaptado de Seto e Yoshida, 2014

Família	Classe	Subclasse	Proteína
HDAC clássica	Classe I		HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
	Classe II	Classe IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
		Classe IIb	HDAC6, HDAC10
	Classe IV		HDAC11
Sirtuínas	Classe III	I	SIRT1, SIRT2, SIRT3
		II	SIRT4
		III	SIRT5
		IV	SIRT6, SIRT7

Alguns achados em estudos *postmortem* de pacientes depressivos demonstraram aumento da metilação dos genes de BDNF e TrkB e, conseqüentemente, diminuição de sua expressão (Ernst et al., 2009a; 2009b; Keller et al., 2011; 2010) e aumento na metilação do gene promotor da subunidade α do receptor GABA A (Poulter et al., 2008) no cérebro desses pacientes. Além disso, estudos com amostras periféricas demonstraram alteração na metilação do gene de BDNF (Fuchikami et al., 2011; Kang et al., 2013; Dell'Osso et al., 2014; Kim et al., 2014), aumento na expressão de HDAC5 (Iga et al., 2007) e alteração nos padrões globais de metilação de DNA em pacientes depressivos (Uddin et al., 2011).

Juntas, essas evidências apontam para o possível envolvimento dos mecanismos epigenéticos como precursores das alterações fisiopatológicas dos transtornos de humor. Sendo assim, sua modulação farmacológica poderia ser uma abordagem terapêutica eficaz no tratamento agudo e de manutenção do humor nesses transtornos.

1.3 FARMACOTERAPIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR

Desde a sua descoberta, cerca de 60 anos atrás, o lítio (Li) ainda é o único fármaco aprovado para o tratamento do TB. Atualmente, além do Li, alguns anticonvulsivantes, como o valproato (VPA) e a carbamazepina, e antipsicóticos atípicos, como olanzapina e quetiapina, têm sido utilizados no tratamento desse

transtorno. Porém, esses fármacos sozinhos não apresentam total eficácia, sendo a polifarmácia altamente aplicada no tratamento deste transtorno (Kapczinski e Quevedo, 2015). Apesar da gravidade, ainda não existe um fármaco completamente eficaz para o tratamento do TB. Assim como em outros transtornos psiquiátricos, o tratamento farmacológico funciona em parte dos pacientes bipolares. Porém, muitos deles possuem altas taxas de recidiva, sintomas que resistem mesmo com o tratamento, diminuição cognitiva e funcional, deficiência psicossocial e diminuição do bem-estar, que reduzem a taxa de adesão ao tratamento por parte dos pacientes (Geddes e Miklowitz, 2013; Kapczinski e Quevedo, 2015).

Com a evolução dos antidepressivos, o tratamento do TDM passou a ter um perfil mais favorável quanto aos efeitos colaterais. Os antidepressivos de primeira geração (tricíclicos e inibidores de monoaminoxidase) possuem efeitos colaterais mais graves, que podem incluir toxicidade cardíaca, boca seca, constipação, retenção urinária, hipotensão/hipertensão, ganho de peso, sedação e dor de cabeça. Já os antidepressivos de segunda geração (inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, bupropiona e mirtazapina) apresentam efeitos colaterais mais brandos. Entretanto, ainda podem ser observados os seguintes efeitos colaterais: náusea, sonolência, tontura, perda de libido e complicações gastrointestinais (Montejo et al., 2015; David e Gouriun, 2016). Atualmente, a fluoxetina é o antidepressivo mais popular devido à quantidade relativamente menor de efeitos adversos (Quevedo e da Silva, 2013). Porém, a terapia para o TDM ainda não é satisfatória. Menos da metade dos pacientes apresentam remissão dos sintomas com o uso de apenas um antidepressivo e até 30% deles não apresenta resposta ao quadro farmacoterápico atual (Mrazek et al., 2014).

Tendo em vista essas importantes lacunas no tratamento dos transtornos de humor, vários estudos têm focado em novos agentes com possíveis efeitos terapêuticos. Dentre os novos alvos terapêuticos estudados, pode-se destacar os moduladores epigenéticos, como o VPA. Este fármaco é amplamente utilizado no tratamento do TB e possui um efeito de supressão da atividade da HDAC, a qual tem sido um alvo com grande enfoque para o tratamento deste transtorno (Hoertel et al., 2013; Fass et al., 2014; Peedicayil, 2014; Brady e Keshavan, 2015; Konstantakopoulos et al., 2015). Diversos agentes possuem efeito inibitório sobre essa enzima, conseqüentemente, aumentando a acetilação de histonas e facilitando

a transcrição de proteínas responsáveis pela homeostase e funcionamento adequado dos neurônios (Camelo et al., 2005).

O inibidor de HDAC mais estudado nos transtornos do humor é o butirato de sódio (BS), um ácido graxo volátil com cadeia de quatro carbonos de baixo peso molecular. O BS é um inibidor não específico das HDACs, com estrutura similar ao do VPA (Chiu et al., 2013). Apesar de ainda não ser aplicado na clínica, estudos recentes indicam que BS, assim como o VPA, modula a cognição e o comportamento, através de mecanismo epigenéticos (Machado-Vieira et al., 2011), apontando seu potencial para aplicação nos transtornos do humor.

De fato, estudos pré-clínicos demonstraram que o BS possui efeito do tipo anti-depressivo em roedores machos e fêmeas submetidos a modelos animais de depressão (Schroeder et al., 2007; Zhu et al., 2009, Valvassori et al., 2014). Além disso, o BS também foi capaz de reverter comportamentos maníacos em animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por anfetamina (Arent et al., 2011; Varela et al., 2015). Esses e outros estudos indicam um potencial efeito estabilizador do humor do BS (Resende et al., 2013). Entretanto, sua aplicação a longo prazo pode estar relacionada a alguns efeitos colaterais como teratogênese e morte celular (Fucic et al., 2010; Khan et al., 2011), sendo necessário maiores estudos sobre os mecanismos de ação dessa substância.

1.4 MODELOS ANIMAIS DE MANIA E DEPRESSÃO

A grande lacuna no conhecimento sobre a neurobiologia e funcionamento cerebral, associadas as limitações éticas e práticas em estudar o cérebro humano *in vivo* são os fatores que impedem o avanço no estudo sobre a neurobiologia e fisiopatologia dos transtornos de humor (Nestler e Hyman, 2010). Apesar do avanço tecnológico das técnicas de neuroimagem nos últimos anos, as técnicas não invasivas ainda não conseguem responder todas as perguntas sobre as disfunções do cérebro humano. Sendo assim, os modelos animais de transtornos psiquiátricos, mais especificamente os transtornos de humor, são uma importante ferramenta para o estudo da neurobiologia do TB e TDM (Valvassori et al., 2013).

Ellenbroek e Cools (1990) propuseram que modelos animais válidos para os transtornos psiquiátricos devem demonstrar os três principais critérios a seguir: validade de face, validade de constructo e validade preditiva. A validade de face indica a habilidade do modelo em mimetizar os sintomas de determinada doença. A

validade de constructo está relacionada com a habilidade do modelo em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos conhecidos da doença. Por último, a validade preditiva está relacionada com a habilidade do modelo em mimetizar o tratamento farmacológico do transtorno (Ellenbroek e Cools, 1990).

O TB possui um curso clínico complexo com alternâncias de humor recorrentes entre episódios maníacos e depressivos, fazendo com que o desenvolvimento de um modelo animal seja desafiador. Até o presente momento, não existe nenhum modelo estabelecido que consiga mimetizar ambos os polos de humor no mesmo animal. Entretanto, o marco clínico para o TB é a presença de sintomas maníacos; assim, estudos pré-clínicos sobre a neurobiologia do TB utilizam modelos que reproduzam características de episódios maníacos, como a hiperatividade, a hipersexualidade, comportamentos de risco e a agressividade (Valvassori et al., 2017a).

Diversos estudos têm demonstrado que a administração de psicoestimulantes, especialmente as anfetaminas (amph) são capazes de induzir hiperlocomoção em animais, além de diversos outros comportamentos do tipo maníacos como comportamento de risco, agressividade e hipersexualidade (Wang et al., 2013; Guarraci e Bolton, 2014; Zhou et al., 2015). Essas drogas são estimulantes do sistema nervoso central e agem aumentando a liberação de dopamina e inibindo sua receptação e degradação (Vasan e Olango, 2018). Uma vez que o aumento da atividade dopaminérgica é uma das principais hipóteses fisiopatológicas do TB (Joyce et al., 1995; Pantazopoulos et al., 2004; Vogel et al., 2004; Zhao et al., 2015), esse modelo apresenta validade de constructo. Sua validade preditiva é demonstrada através da capacidade do modelo em responder a estabilizadores do humor clássicos, como o Li e o VPA (Frey et al., 2006).

A injeção intracerebroventricular (ICV) de ouabaína (OUA) foi descrita como modelo animal de mania por Li et al. (1997). A microinjeção de OUA é capaz de induzir hiperatividade em animais através da inibição da enzima Na^+/K^+ -ATPase, induzindo a despolarização prolongada e aumento da liberação de neurotransmissores. A atividade reduzida dessa enzima também é observada em pacientes bipolares (Looney e El-Mallakh, 1997), apontando as validades de face e constructo desse modelo. O tratamento com os estabilizadores do humor Li e VPA são capazes de reverter o comportamento do tipo maníaco, bem como o estresse oxidativo e a diminuição de níveis de neurotrofinas causados pela administração de OUA (Jornada et al., 2010; 2011), mostrando sua validade de constructo.

O protocolo de privação do sono paradoxal (PSP) em camundongos tem sido considerado um bom modelo animal de mania ambiental, sendo capaz de induzir comportamentos do tipo maníaco clássicos como hiperatividade e comportamento agressivo (Arent et al., 2015; Sung, 2017). Os principais mecanismos que comprovam a validade de constructo desse modelo são as alterações no ciclo circadiano e anormalidade nas sinalizações da proteína quinase C (PKC), alterações que também são observadas em pacientes (Hahn et al., 2005; Szabo et al., 2009). Li e VPA também são capazes de reverter os sintomas maníacos induzido pela PSP (Streck et al., 2015; Valvassori et al., 2017b)

O cuidado parental é um comportamento fortemente estabelecido em roedores, sendo essencial para o desenvolvimento saudável da prole. O modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM), descrito primeiramente por Levine et al. (1967), baseia-se na restrição do cuidado materno para induzir comportamentos do tipo depressivo em animais adultos, após períodos de separação materna no início da vida, mimetizando a incidência de depressão após esse gatilho em pacientes. Esse modelo é capaz de induzir vários comportamentos do tipo depressivo, como aumento no tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda e diminuição do consumo de alimento doce. Além disso, o modelo também consegue mimetizar algumas alterações fisiopatológicas como dano no metabolismo energético, aumento do estresse oxidativo, desregulação imune e diminuição dos níveis de neurotrofinas (Marco et al., 2015). O tratamento com antidepressivos clássicos como imipramina e tianeptina são capazes de reverter todas essas alterações, comprovando a validade preditiva desse modelo (Della et al., 2013; Réus et al., 2013).

Como descrito anteriormente, o estresse na vida adulta pode ser um dos gatilhos para o desenvolvimento do TDM em pacientes, o modelo de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM), descrito originalmente por Katz (1981), baseia-se nessa premissa para induzir comportamento depressivo em roedores. Após a exposição crônica diária a diferentes e imprevisíveis estímulos estressores, os animais passam a expressar comportamentos do tipo depressivo, como aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado e de suspensão pela cauda e diminuição no consumo de alimento doce. Essas alterações são acompanhadas por aumento do estresse oxidativo, alterações mitocondriais, aumento dos níveis de corticosterona, diminuição dos níveis de fatores neurotróficos e alterações imunes

(Willner, 2016). Essas alterações também são revertidas após o tratamento com antidepressivos clássicos, como a imipramina e citalopram (Papp et al., 2017; Willner et al., 2018).

1.5 JUSTIFICATIVA

É importante que alguns pontos sejam ressaltados: 1) o tratamento dos transtornos do humor não é totalmente eficaz; 2) a etiologia dos transtornos do humor parece envolver fatores genéticos e ambientais, apontando para o envolvimento das alterações epigenéticas em sua fisiopatologia; e 3) os inibidores de HDAC possuem um potencial promissor como moduladores do humor; entretanto, seus mecanismos de ação ainda não são completamente conhecidos. Portanto, é de extrema importância conhecer as alterações epigenéticas induzidas pelo BS em modelos animais de mania e depressão, afim de melhor descrever a fisiopatologia desses transtornos, bem como novas possibilidade de abordagens terapêuticas para os mesmos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos inibidores de HDAC sobre comportamento e alterações epigenéticas em cérebro de ratos submetidos a modelos animais de mania e depressão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar os efeitos do tratamento com BS e VPA sobre a atividade locomotora e exploratória de animais submetidos aos modelos animais de mania induzidos por dextro anfetamina (d-amph), OUA e PSP.

2- Avaliar os efeitos do tratamento com BS sobre o comportamento do tipo depressivo em ratos submetidos aos modelos animais de depressão induzidos por ECM e PM.

3- Avaliar os efeitos do tratamento com BS e VPA sobre a atividade de HDAC, HAT e DNMT no córtex frontal, hipocampo e estriado de animais submetidos aos modelos animais de mania induzido por d-amph OUA e PSP.

4- Avaliar os efeitos do tratamento com BS sobre a atividade de HDAC, HAT e DNMT no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos aos modelos animais de depressão induzidos por ECM e PM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Nesse estudo foram utilizados 154 ratos Wistar adultos machos; 10 ratas Wistar adultas fêmeas e 42 camundongos black C57BL/6 adultos machos provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e comida e o ambiente mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os protocolos foram iniciados somente após a aprovação do Comitê de Ético no Uso de Animais da UNESC (CEUA-UNESC) sob os protocolos de número 102/2012 e 007/2016-1.

3.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Modelo animal de mania induzido por d-amph

O presente protocolo experimental teve duração de 14 dias e mimetizou o tratamento de um episódio de mania aguda e foi primeiramente descrito por Frey et al. (2006). Nesse protocolo, ratos Wistar machos foram submetidos a injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de d-amph, na concentração de 2 mg/kg, ou solução salina (Sal) para o grupo controle, durante 14 dias. Do oitavo ao décimo quarto dia, além das injeções de d-amph, os animais foram tratados com duas injeções i.p. diárias de VPA (Sanofi-Aventis, Brasil) (200mg/kg), BS (Sigma-Aldrich, USA) (600mg/kg) ou Sal afim de reverter o comportamento do tipo maníaco. No décimo quinto dia, vinte quatro horas após as últimas injeções, os animais receberam uma única injeção de d-amph, e duas horas após foram submetidos ao teste comportamental (Figura 4). Dessa forma, foram utilizados 48 animais divididos em 6 grupos (Sal+Sal, Sal+VPA, Sal+BS, AMPH+Sal, AMPH+VPA e AMPH+BS). Todas as substâncias foram administradas em um volume de 1mL/kg. A concentração de d-amph, VPA e BS foram baseadas em estudos prévios (Frey et al., 2006; Jornada et al., 2010; Moretti et al., 2011; da-Rosa et al., 2012).

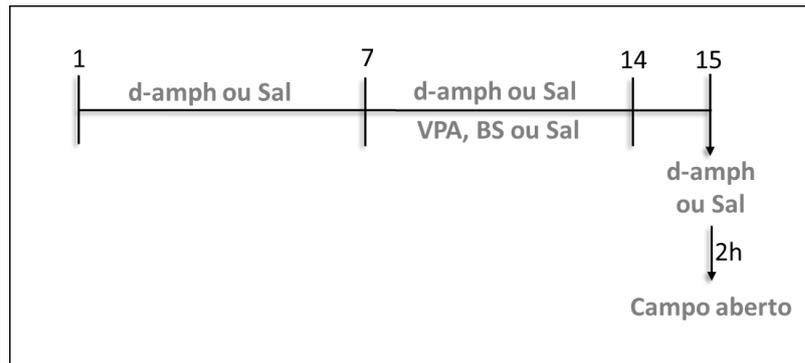


Figura 4: Esquema do protocolo do modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina (d-amph). Os animais receberam, diariamente, uma injeção de d-amph ou salina (Sal). Do oitavo ao décimo quarto dia, além das injeções de metanfetamina, os animais foram tratados com duas injeções intraperitoneais diárias de valproato (VPA), butirato de sódio (BS) ou sal. No décimo quinto dia os animais receberam uma única dose de d-amph ou salina e duas horas após, foram submetidos ao teste de campo aberto. Fonte: Do autor.

3.2.2 Modelo animal de mania induzido por PSP

O protocolo de privação foi previamente descrito por Armani et al. (2012). O presente estudo adotou o período de privação do sono de 36h, uma vez que esse período aumenta a atividade locomotora em animais, que é considerada um comportamento do tipo maníaco. Nesse protocolo, camundongos machos receberam injeções i.p. de salina, VPA ou BS durante 7 dias, duas vezes ao dia. A PSP iniciou no sexto dia de tratamento às 18:00 horas. Os camundongos foram dispostos em 5 animais por caixa (38x31x17cm), cada caixa possuía 12 plataformas (3.5cm de diâmetro). Na mesma caixa foi adicionado um volume de água de 2 centímetros de altura, obrigando os animais a ficarem sobre as plataformas. Os animais poderiam se movimentar livremente de uma plataforma para outra. Assim, quando os animais entravam na fase paradoxal do sono, devido a atonia muscular, eles eram acordados caindo na água. Comida e água foram disponibilizados a vontade durante todo o protocolo de privação. Os animais do grupo controle foram expostos as mesmas condições experimentais; entretanto, não havia água no fundo da caixa. Após o período de privação, os animais foram acondicionados em uma caixa com maravalha seca durante 5 minutos e logo após foram submetidos ao teste de campo aberto (Figura 5). Dessa forma, foram utilizados 42 animais divididos em 6 grupos (Controle+Sal, Controle+VPA, Controle+BS, PSP+Sal, PSP+VPA e PSP+BS).

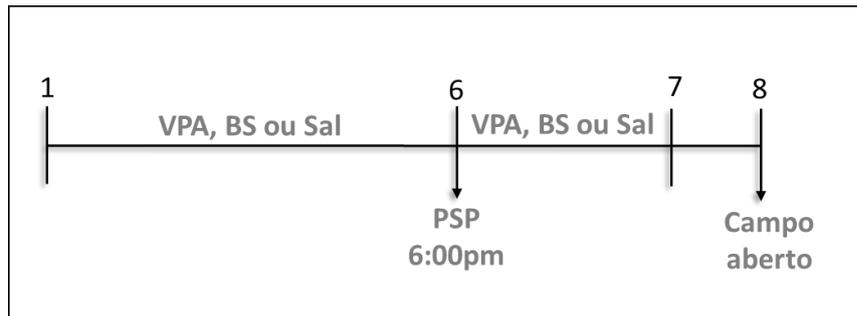


Figura 5: Esquema do protocolo do modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP). Os animais receberam, diariamente, duas injeções de valproato (VPA), butirato de sódio (BS) ou sal durante 7 dias. A partir das seis horas da tarde do sexto dia foi iniciado o protocolo de privação de sono de 36 horas. No oitavo dia os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Fonte: Do autor.

3.2.3 Modelo animal de mania induzido por OUA

O modelo de OUA foi realizado segundo descrito por Jornada et al. (2010), mimetizando o tratamento de reversão de um episódio agudo de mania. Nesse protocolo, os ratos Wistar machos foram anestesiados via intramuscular com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) em uma proporção de 2:1 respectivamente, com um volume de 1ml/kg. Em um aparelho estereotaxico, a pele do crânio dos animais foi removida e, através de um orifício de 2mm de diâmetro no crânio do animal, uma cânula guia de calibre 27 e 9mm de comprimento foi implantada a 0.9mm posterior ao bregma, 1.5mm a direita da linha central e 2.6mm ventralmente em relação a superfície do crânio (1.0mm acima do ventrículo cerebral lateral). A cânula foi fixada com cimento acrílico dental e os animais permaneceram em repouso durante 3 dias sem serem manipulados.

Após a recuperação, os animais receberam uma única injeção intracerebroventricular de 5µl de OUA na concentração de $10^{-3}M$, diluída em líquido artificial (aCSF – do inglês *artificial cerebrospinal fluid*) ou 5µl de aCSF para o grupo controle. Para isso, uma cânula de calibre 30 foi colocada dentro da cânula guia e conectada a uma microseringa, através de um tubo de polietileno. A ponta da cânula de infusão sobressaia 1.0mm além da cânula guia, alcançando o ventrículo cerebral lateral direito. A partir do dia seguinte a injeção de OUA ou aCSF, os ratos foram tratados durante 7 dias com injeções i.p. de salina, VPA ou BS duas vezes ao dia. Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (Figura 6). Dessa forma, foram utilizados 42 animais, divididos em 6 grupos (aCSF+Sal, aCSF+VPA, aCSF+BS, OUA+Sal, OUA+VPA e OUA+BS).

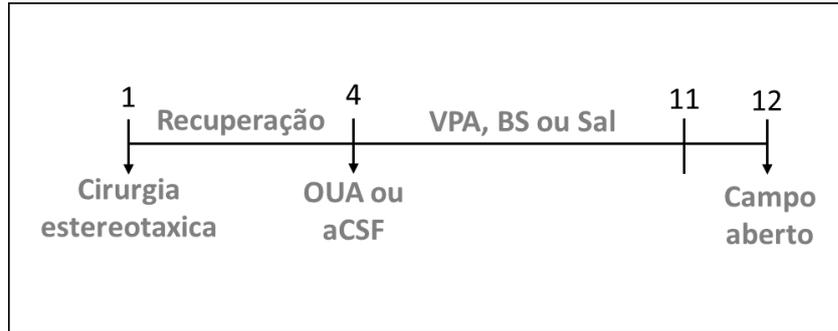


Figura 6: Esquema do protocolo do modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA). No primeiro dia os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação da cânula guia no ventrículo lateral direito. No quarto dia os animais receberam uma única injeção intracerebroventricular de OUA ou líquido artificial (aCSF). Do quinto ao décimo primeiro dia, os animais foram tratados com duas injeções intraperitoneais diárias de valproato (VPA), butirato de sódio (BS) ou salina (Sal). Vinte e quatro horas após a última injeção, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Fonte: Do autor.

3.2.4 Modelo animal de depressão induzido por PM

A PM foi realizada de acordo com Mello et al. (2009). Nesse protocolo os animais foram privados da presença da mãe por 180 minutos por dia do primeiro dia pós-natal (DPN) até o 10º DPN. O protocolo de PM foi realizado retirando a mãe da gaiola. Os filhotes eram mantidos na gaiola (com o odor da mãe). Após cada sessão de PM as mães eram colocadas nas suas respectivas gaiolas novamente. Os animais controle permaneceram em suas gaiolas juntamente com suas mães durante todo o período pós-natal. No 21º DPN, os ratos de ambos os grupos, controle e privado, foram desmamados.

O BS ou Sal foram injetados i.p. duas vezes ao dia, durante sete dias, após os animais alcançarem dois meses de idade. Os tratamentos foram administrados num volume de 1mL/kg. No último dia de tratamento, os animais foram submetidos a sessão de treino de nado forçado antes de receberem a injeção. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram submetidos a sessão de teste do nado forçado (descrito na seção de testes comportamentais) (Figura 7). Os animais foram randomicamente divididos nos grupos PM e controle antes do início do tratamento. Para o desenvolvimento desse estudo, foram utilizados 32 animais (n=8), separados em quatro grupos, como descritos a seguir: 1) Controle+Sal; 2) Controle+BS; 3) PM+Sal; 4) PM+BS.

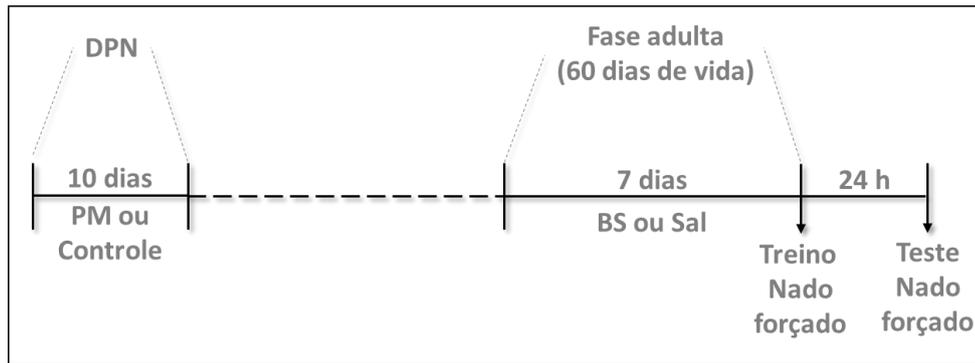


Figura 7: Esquema do protocolo do modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM). Os animais foram privados da presença materna durante 3 horas por dia nos 10 primeiros dias pós-natal (DPN). Quando completaram 60 dias, os animais receberam duas injeções diárias de butirato de sódio (BS) ou solução salina (Sal) durante 7 dias. No último dia de tratamento os animais foram submetidos ao treino do nado forçado e 24 após ao teste do nado forçado. Fonte: Do autor.

3.2.5 Modelo animal de depressão induzido por ECM

O protocolo de ECM foi realizado de acordo com Gamaro et al. (2003). Os animais estressados foram submetidos a quarenta dias de situações imprevisíveis de estresse leve utilizadas para avaliar o comportamento do tipo depressivo em ratos tratados com BS ou Sal. Os tipos de estressores e o tempo de aplicação de cada um estão descritos no quadro abaixo:

Tempo de exposição ao estresse	Estressor
24 horas	Privação de comida
24 horas	Privação de água
1-3 horas	Contenção
1,5-2 horas	Contenção à 4°C
120-210 minutos	Exposição à luz estroboscópica
2-3 dias	isolamento

Os animais foram submetidos aos estímulos estressores em diferentes períodos todos os dias, a fim de minimizar a previsibilidade. A contenção foi realizada acondicionando o animal em tubos de plástico, sem espaço para movimentar-se, permanecendo imobilizado durante todo o processo. A exposição à luz estroboscópica foi conduzida colocando o animal em uma caixa com uma lâmpada intermitente de 40 watts com frequência de 60 flashes por minuto.

BS ou Sal foram injetados i.p. duas vezes ao dia, durante 7 dias após o término do protocolo de ECM. Todos os tratamentos foram administrados em um volume de 1mL/kg. No último dia de tratamento os animais foram submetidos a sessão de treino de nado forçado antes de receberem a injeção. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram submetidos a sessão de teste do nado forçado (Figura 8). Para o desenvolvimento desse protocolo, foram empregados 32 animais

(n=8), com quatro grupos, como descritos a seguir: 1) Controle+Sal; 2) Controle+BS; 3)ECM+Sal; 4)ECM+BS.

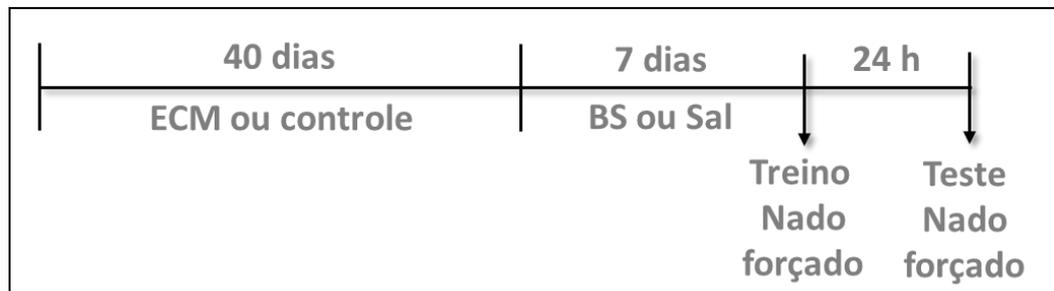


Figura 8: Esquema do protocolo do modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM). Ratos adultos foram submetidos a 40 dias de estresse diário. Após o término do protocolo de ECM os animais foram tratados com duas injeções diárias de butirato de sódio (BS) ou solução salina (Sal) durante 7 dias. No último dia de tratamento os animais foram submetidos ao treino do nado forçado e 24 após ao teste do nado forçado. Fonte: Do autor.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Teste do campo aberto

A atividade locomotora e exploratória foram avaliadas através do teste de campo aberto, que consiste em uma caixa de 40 x 60 cm para ratos e 40 x 40 cm para camundongos, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada branca, com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para explorar livremente a arena durante cinco minutos. A atividade locomotora foi calculada contando, com ajuda de contadores, o número de cruzamentos feito pelo animal entre as linhas pretas. A atividade exploratória foi calculada contando a quantidade de levantamentos quando os animais ficam apoiados nas patas traseiras (Figura 9).

3.3.2 Teste de nado forçado

O teste de nado forçado foi realizado de acordo com a descrição de Porsolt et al (1977). Esse teste envolve duas sessões denominadas treino e teste, realizados em um tanque de formato cilíndrico cheio de água à uma temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$ e profundidade o suficiente para o animal não conseguir tocar o fundo do tanque ou escapar. Na sessão de treino, o animal é colocado na água e deixado nadar livremente durante 15 minutos. 24 horas após o treino, o animal é recolocado no tanque para a sessão de teste. Nessa sessão é contado o tempo em que o animal nada pelo cilindro (natação), o tempo que o animal fica imóvel na água, sem a

intenção de nadar (imobilidade), e o tempo que o animal tenta escalar as paredes do cilindro com a intenção de escapar da arena (escalada) (Figura 10). Esse comportamento é uma representação da desmotivação vista em pacientes.

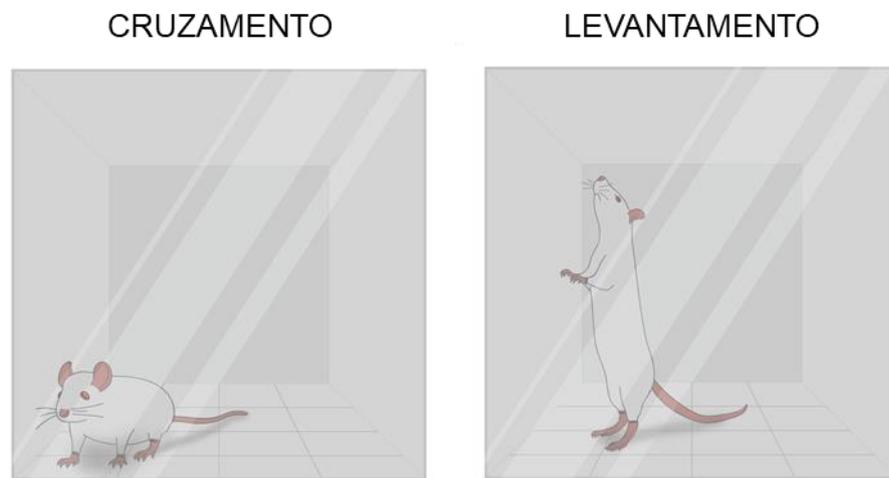


Figura 9: Representação dos parâmetros de cruzamento e levantamento avaliados no teste de campo aberto. Fonte: Modificado de Valvassori et al., 2017a.

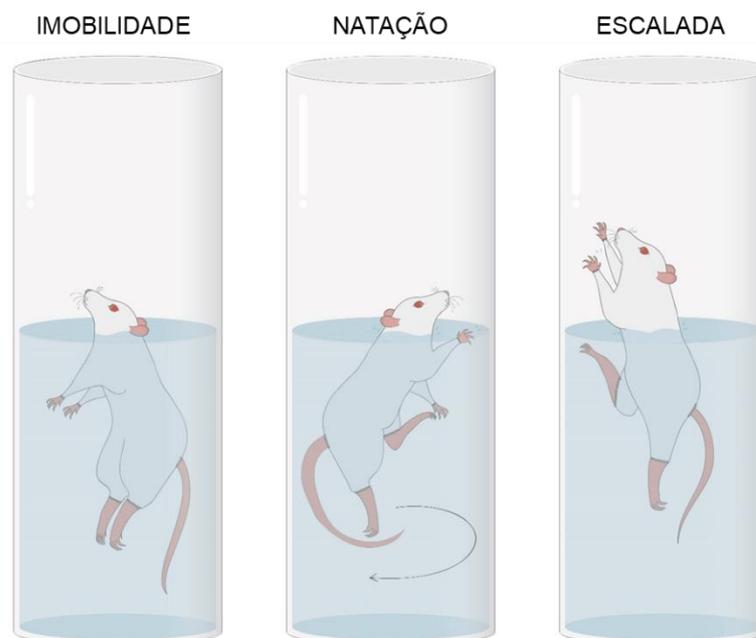


Figura 10: Representação dos parâmetros de imobilidade, natação e escalada avaliados no teste de nado forçado. Fonte: Modificado de Valvassori et al., 2017a

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Imediatamente após os testes de campo aberto e nado forçado, os animais foram mortos por decapitação (para ratos) ou deslocamento cervical (para camundongos) e o cérebro dissecado em córtex frontal, hipocampo e estriado, de

acordo com o método descrito por Glowinski e Iversen (1965). As amostras de tecido cerebral foram acondicionadas em microtubos previamente identificados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo após, as amostras foram armazenadas a -80 °C para posterior análise bioquímica.

3.4.1 Preparação dos extratos nucleares

Primeiramente, todas as amostras de tecido cerebral foram submetidas ao protocolo de extração nuclear. O protocolo de extração nuclear foi realizado através do kit *EpiQuik Nuclear Extraction Kit* de acordo com as instruções do fabricante (EPIGENTEK[®], USA).

Resumidamente, as amostras de tecido cerebral foram pesadas, fatiadas em pequenos pedaços e homogeneizados em tampão de lise citoplasmático contendo ditioneitol (DTT) e inibidores de protease. A suspensão foi mantida em gelo durante 15 minutos e depois centrifugada a 250 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante, fração citosólica, foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em dois volumes de tampão de lise citoplasmático gelado. A suspensão foi homogeneizada utilizando uma ponteira de 200µl e centrifugada em 8000 x g durante 20 min a 4 °C. O sedimento resultante continha a porção nuclear da célula lisada. O sedimento foi ressuspensão em tampão de extração nuclear contendo inibidores de protease e DTT, e a suspensão foi homogeneizada com uma ponteira de 200µl. A amostra resultante foi mantida em agitação lenta durante 30-60 min num agitador orbital, a 4 °C. Após, a suspensão nuclear foi centrifugada em 16000 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante contendo o extrato nuclear foi transferido para dois microtubos, o primeiro tubo contendo uma alíquota de 20 µl para análise de concentração de proteína, e o segundo tubo contendo o restante do sobrenadante para as posteriores análises enzimáticas. Ambos os tubos foram armazenados a -80°C até o momento dos ensaios seguintes. A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951).

3.4.2 Avaliação da atividade da HDAC

Os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para a avaliação da atividade das HDACs através do kit de detecção colorimétrica *EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit* de acordo com as instruções do fabricante (EPIGENTEK[®], USA). O *EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit* foi desenvolvido para mensuração total de atividade de HDAC, nessa análise, o único substrato de histona acetilada é capturado estavelmente nos poços da microplaca. As HDACs

ativas se ligam e desacetilam o substrato de histona. O restante de substrato não desacetilado pode ser reconhecido com um anticorpo de histona acetilada de alta afinidade. A quantidade de histona não desacetilada, que é inversamente proporcional a atividade de HDAC, é então quantificada colorimetricamente através de uma reação do tipo ensaio de imunodeteção enzimática (ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Resumidamente, uma placa de 96 poços, foi pré-incubada com 50 µl de tampão de ensaio de HDAC mais substrato de ensaio de HDAC durante 60 minutos a temperatura ambiente. Concomitantemente, uma curva padrão foi feita com diluições em série de substratos do kit de HDAC e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Após a incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem e 2µl de cada amostra de extrato nuclear foram pipetados nos poços e incubados por 60 minutos a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação, os poços foram novamente lavados com tampão de lavagem e incubados a temperatura ambiente com 50µl de anticorpo de captura por 60 minutos em um agitador orbital (50-100rpm). Os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados a temperatura ambiente com 50µl de anticorpo de detecção por 30 minutos. Os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados a temperatura ambiente e protegidos da luz com 100µl de solução de desenvolvimento por 2-10 minutos (o tempo de incubação variou de acordo com a desenvolvimento da coloração azul na curva padrão e nas amostras). Após a incubação foi adicionado 50µl de *stop solution* em cada poço e a leitura colorimétrica foi realizada imediatamente após em um leitor de placas de ELISA, em um comprimento de onda de 450 nm (O protocolo está exemplificado na Figura 11).

Após a leitura de absorbância, atividade de HDACs em ng/h/ml foi então calculada através seguinte fórmula:

$$\text{Atividade de HDAC (ng/h/ml)} = \frac{[\text{DO (controle - branco)} - \text{DO (amostra - branco)}]}{\text{Curva x tempo de reação (1h)}} \times \text{diluição da amostra}$$



Figura 11: Esquema do procedimento das análises do EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit; EpiQuik DNA Methyltransferase (DNMT) Activity/Inhibition Assay Kit e EpiQuik HAT Activity/Inhibition Assay Kit. Fonte: Modificado de EPIGENTEK®, 2015

3.4.3 Avaliação da atividade da DNMT

Os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para a avaliação da atividade das DNMTs, através do kit de detecção colorimétrica *EpiQuik DNA Methyltransferase (DNMT) Activity/Inhibition Assay Kit* de acordo com as instruções do fabricante (EPIGENTEK®, USA). Nessa análise, o substrato universal de DNMT é estavelmente aderido nos poços de uma microplaca. As enzimas DNMT transferem um grupamento metil do adomet para a citosina do substrato de DNA metilado, e o DNA metilado pode ser reconhecido com um anticorpo anti-5-metilcitosina. A quantidade de DNA metilado, que é proporcional a atividade enzimática, foi então analisada através de uma reação do tipo ELISA, lendo a absorbância na microplaca.

Resumidamente, em uma placa de 96 poços, 3µl de extrato nuclear foram incubados com 24µl de tampão de ensaio e 3µl de substrato de ensaio (s-adenosil-l-metionina) durante 90 minutos a 37°C. Concomitantemente aos extratos nucleares, uma curva padrão foi feita com diluições em série de substratos do kit de DNMT e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Após a incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem e em seguida incubados com 50µl de anticorpo de captura a temperatura ambiente por 60 minutos em agitador orbital (50-100rpm). Após essa incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem e novamente incubados com 50µl de anticorpo de detecção a temperatura ambiente por 60 minutos. Após a incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados com 100µl de solução de desenvolvimento a temperatura ambiente e

protegidos da luz por 2-10 minutos (o tempo de incubação variou de acordo com a desenvolvimento da coloração azul na curva padrão e nas amostras). Após a incubação foi adicionado 50µl de *stop solution* em cada poço e a leitura colorimétrica foi realizada imediatamente após em um leitor de placas de ELISA, em um comprimento de onda de 450 nm (O protocolo de ELISA está exemplificado na Figura 11).

Após a leitura de absorbância, a atividade de DNMTs em DO/h/mg foi então calculada através seguinte formula:

$$\text{Atividade de DNMT (DO/h/mg)} = \frac{\text{DO amostra} - \text{DO branco}}{\text{Concentração de proteína } (\mu\text{g}) \times \text{tempo de reação}} \times 1000$$

3.4.4 Avaliação da atividade da HAT

Os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para a avaliação da atividade das HATs através do kit de detecção colorimétrica *EpiQuik HAT Activity/Inhibition Assay Kit* de acordo com as instruções do fabricante (EPIGENTEK®, USA). O *EpiQuik™ HAT Activity/Inhibition Assay Kit* é utilizado para mensurar a atividade total de HAT. Em uma análise com esse kit, o substrato de histona é estavelmente capturado nos poços. As HATs ativas se ligam e acetilam o substrato de histona. O substrato acetilado pode ser reconhecido com um anticorpo anti-histona acetilada de alta afinidade. A razão ou quantidade de histona acetilada, que é diretamente proporcional a atividade enzimática de HAT, foi então colorimetricamente quantificada através de uma reação do tipo ELISA.

Resumidamente, uma placa de 96 poços foi pré-incubada com 50 µl de substrato de HAT durante 45 minutos a temperatura ambiente. Concomitantemente, uma curva padrão foi feita com diluições em série de substratos do kit de HDAC e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Após a incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem. 2µl de extrato nuclear foram pipetados em cada poço, juntamente com 26µl de tampão de ensaio de HAT e 2µl de Acetil-CoA e incubados a 37°C por 60 minutos. Os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados com 50µl de anticorpo de captura a temperatura ambiente por 60 minutos em agitador orbital. Os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados com 50µl de anticorpo de detecção a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação os poços foram lavados com tampão de lavagem e incubados novamente com 100µl de solução de desenvolvimento a temperatura

ambiente e protegidos da luz por 2-10 minutos (o tempo de incubação variou de acordo com a desenvolvimento da coloração azul na curva padrão e nas amostras). Após a incubação foi adicionado 50µl de *stop solution* em cada poço e a leitura colorimétrica foi realizada imediatamente após em um leitor de placas de ELISA, em um comprimento de onda de 450 nm (O protocolo de ELISA está exemplificado na Figura 11).

Após a leitura de absorbância, atividade de HDAC em ng/h/mg foi então calculada através seguinte formula:

$$\text{Atividade de HAT (ng/h/mg)} = \frac{\text{DO amostra} - \text{DO branco}}{\text{Curva} \times \text{tempo de reação (h)} \times \text{concentração de proteína (}\mu\text{g)}} \times 1000$$

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados de comportamento e das atividades enzimáticas foram realizadas nos softwares SPSS 20 (IBM®) e STATISTICA 8 (Statsoft®). Teste de Shapiro-wilk foi realizado para avaliar se os resultados possuíam distribuição normal. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-hoc de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. Os gráficos foram gerados no software Prism 6 (GraphPad®) e os dados estão apresentados em média (barras) e erro da média (barras de erro).

As correlações foram analisadas através do teste de Pearson no software Prism 6 (GraphPad®). O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para analisar a força da relação entre as variáveis, classificando o valor de r^2 da seguinte forma: 0-0.19 = muito fraca; 0.2-0.39 = fraca; 0.4-0.65 = moderada; 0.7-0.89 = forte; 0.9-1.0 = muito forte. Em todas as comparações um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR D-AMPH

A Figura 12 demonstra os efeitos comportamentais dos inibidores de HDAC no modelo animal de mania induzido por d-amph. A administração repetida de d-amph aumentou o número de cruzamentos e levantamentos dos animais, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com ambos os inibidores de HDAC, VPA e BS, foram capazes de reverter a hiperatividade induzida por d-amph. É interessante notar que VPA e BS *per se* não afetaram o comportamento no grupo controle.

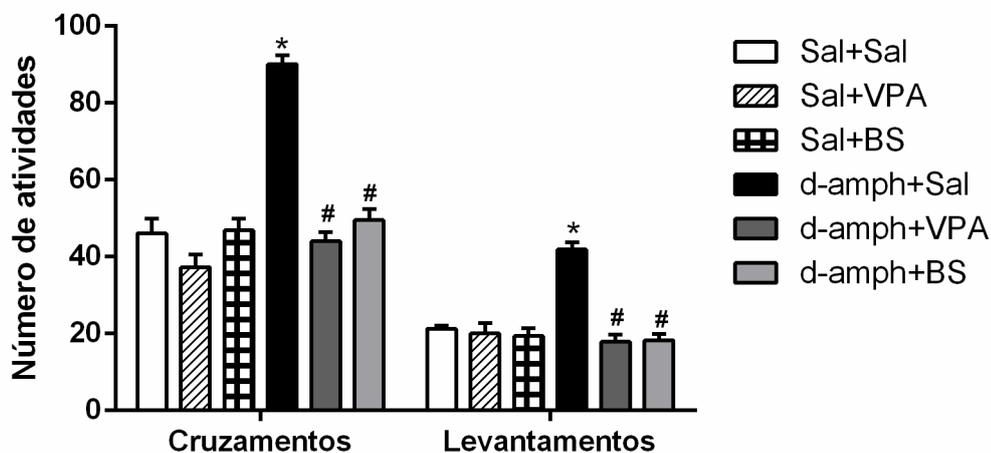


Figura 12: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre o número de cruzamentos e levantamentos, no teste de campo aberto, de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por dextro-anfetmina (d-amph). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p \leq 0,05$ comparado com grupo Sal+Sal; #= $p < 0,05$ comparado com o grupo d-amph+Sal, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

Dados do ANOVA de duas vias para a administração de d-amph: [cruzamentos: $F(1,42)=52,860$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(1,42)=13,2843$, $p < 0,001$]; para o tratamento com VPA ou BS [cruzamentos: $F(2,42)=44,937$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(2,42)=28,3355$, $p < 0,001$] e para a interação entre d-amph e tratamentos [cruzamentos: $F(2,42)=28,902$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(2,42)=21,8175$, $p < 0,001$].

A figura 13 demonstra a atividade de HDAC no córtex frontal (figura13A), hipocampo (figura13B) e estriado (figura13C) de ratos. A administração de VPA e BS *per se* diminuíram a atividade de HDAC em todas as estruturas cerebrais. A administração crônica de d-amph foi capaz de aumentar a atividade de HDAC no hipocampo e estriado, mas não no córtex frontal, quando comparado com o grupo controle. VPA foi capaz de reverter essa alteração causada por d-amph no

hipocampo e estriado. BS foi capaz de reverter essa alteração em todas as estruturas. Como demonstrado na figura 14, d-amph aumentou atividade de DNMT no córtex frontal (figura 14A), hipocampo (figura 14B) e estriado (figura 14C). Tanto o tratamento com VPA quanto BS foi capaz de reverter essa alteração em todas as três estruturas cerebrais. Nenhuma alteração foi observada em atividade de HAT (figura 15).

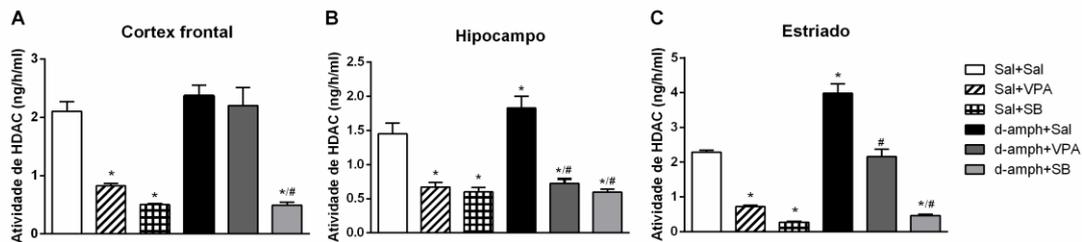


Figura 13: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de histona deacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina (d-amph). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo Sal+Sal; #= $p < 0,05$ comparado com o grupo d-amph+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

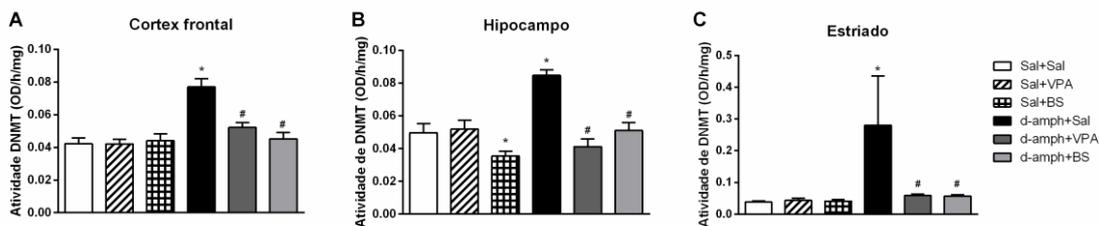


Figura 14: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina (d-amph). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo Sal+Sal; #= $p < 0,05$ comparado com o grupo d-amph+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

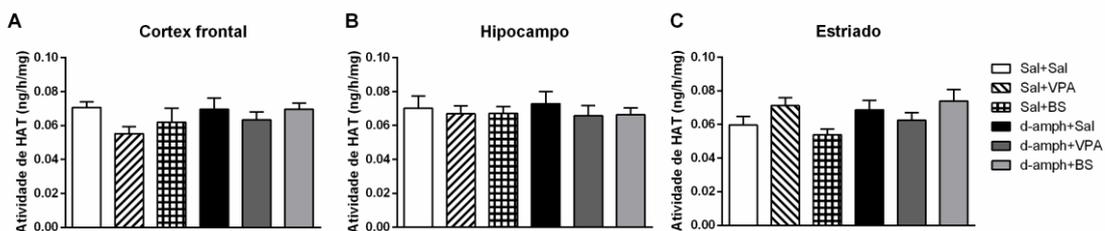


Figura 15: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona acetiltransferase (HAT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina (d-amph). As barras representam media \pm erro padrão.

Dados do ANOVA de duas vias para a administração de d-amph: [HDAC córtex frontal: $F(1,24)=16,5816$, $p < 0,001$; HDAC hipocampo: $F(1,24)=2,5526$, $p=0,123$; HDAC Estriado: $F(1,24)=85,5294$, $p < 0,001$; DNMT córtex frontal: $F(1,24)=23,177$, $p < 0,001$; DNMT hipocampo: $F(1,24)=12,6236$, $p=0,001$; DNMT

estriado: $F(1,24)=3,10624$, $p=0,090$]; para tratamento com BS ou VPA [HDAC córtex frontal: $F(2,24)=56,8182$, $p<0,001$; HDAC hipocampo: $F(2,24)=57,0130$, $p<0,001$; HDAC estriado: $F(2,24)=181,1033$, $p<0,001$; DNMT córtex frontal: $F(2,24)=8,540$, $p=0,001$; DNMT hipocampo: $F(2,24)=15,9040$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(2,24)=1,97546$, $p=0,160$] e para interação entre administração de d-amph vs tratamentos [HDAC córtex frontal: $F(2,24)=9,9678$, $p<0,001$; HDAC hipocampo: $F(2,24)=1,8223$, $p=0,183$; HDAC estriado: $F(2,24)=15,1251$, $p=0,001$; DNMT córtex frontal: $F(2,24)=10,147$, $p<0,001$; DNMT hipocampo: $F(2,24)=12,3906$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(2,24)=2,13177$, $p=0,140$].

A figura 16 demonstra a correlação entre o número de cruzamentos e atividade de HDAC e atividade de DNMT em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Como pode ser observado, existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o número de cruzamento vs. atividade de HDAC (figura 16A, 16B e 16C) e entre o número de cruzamentos vs atividade de DNMT (figura 16D, 16E e 16F) no córtex frontal, hipocampo e estriado. A correlação entre atividade HDAC e atividade DNMT também é demonstrada na figura 16. Os resultados demonstram que existe uma correlação positiva entre atividade de HDAC e atividade de DNMT no córtex frontal, hipocampo e estriado (figura 16G, 16H e 16I).

Dados da correlação para atividade de HDAC vs número de cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,4284$ (moderada), $p<0,001$; hipocampo: $r^2=0,1803$ (muito fraca), $p=0,0194$; estriado: $r^2=0,4287$ (moderada), $p<0,001$]; para atividade de DNMT vs número de cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,5588$ (moderada), $p<0,0001$; hipocampo: $r^2=0,4757$ (moderada), $p<0,0001$; estriado: $r^2= 0,5196$ (moderada), $p<0,0001$]; para atividade HDAC vs atividade de DNMT [córtex frontal: $r^2= 0,3549$ (fraca), $p<0,001$; Hipocampo: $r^2= 0,2145$ (fraca), $p=0,01$; estriado: $r^2= 0,4786$ (moderada), $p<0,001$].

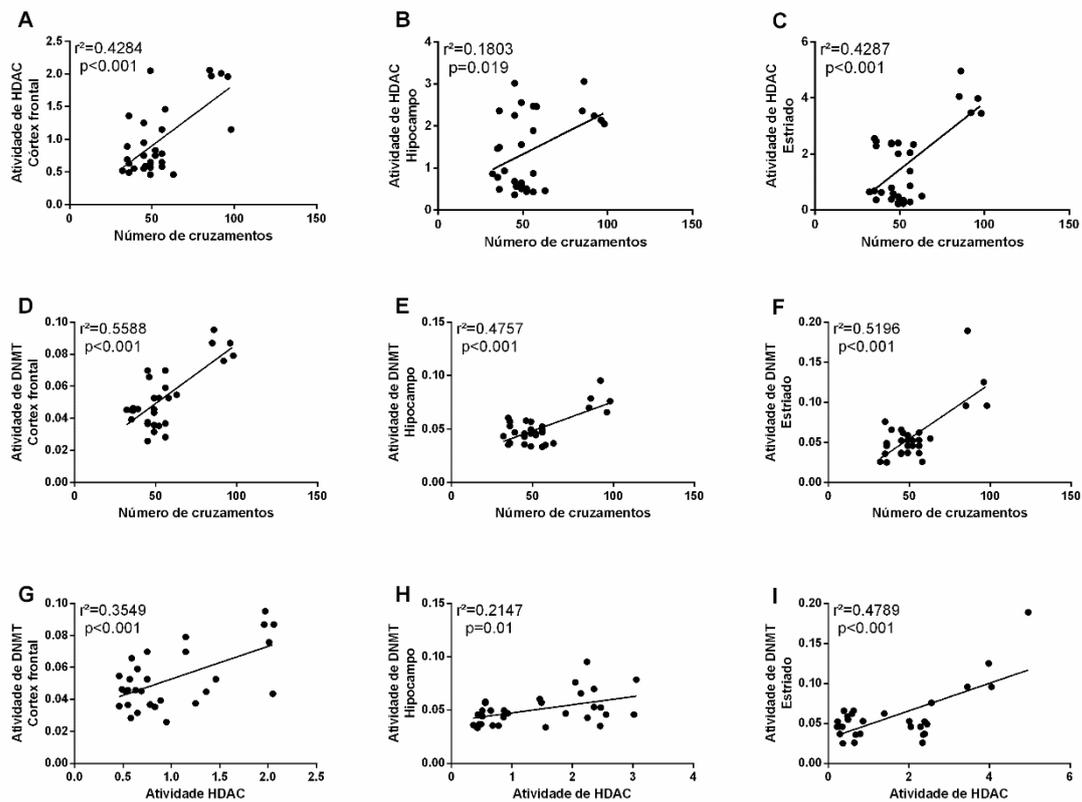


Figura 16: Correlação entre o número de cruzamentos vs. atividade de histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (5A), hipocampo (5B) e estriado (5C); número de cruzamentos vs atividade de DNA metiltransferase (DNMT) córtex frontal (5D), hipocampo (5E) e estriado (5F); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no córtex frontal (5G), hipocampo (5H) e estriado (5I); de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por dextro-anfetamina. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

4.2 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR PRIVAÇÃO DO SONO PARADOXAL

O protocolo de PSP foi capaz de induzir um aumento no número de cruzamentos e levantamentos em camundongos comparados ao grupo controle, como demonstrado na figura 17. O tratamento com VPA e BS *per se* não afetaram os parâmetros comportamentais; entretanto, os inibidores de HDAC foram capazes de reverter a hiperatividade induzida pela PSP em ambos os parâmetros, cruzamentos e levantamentos.

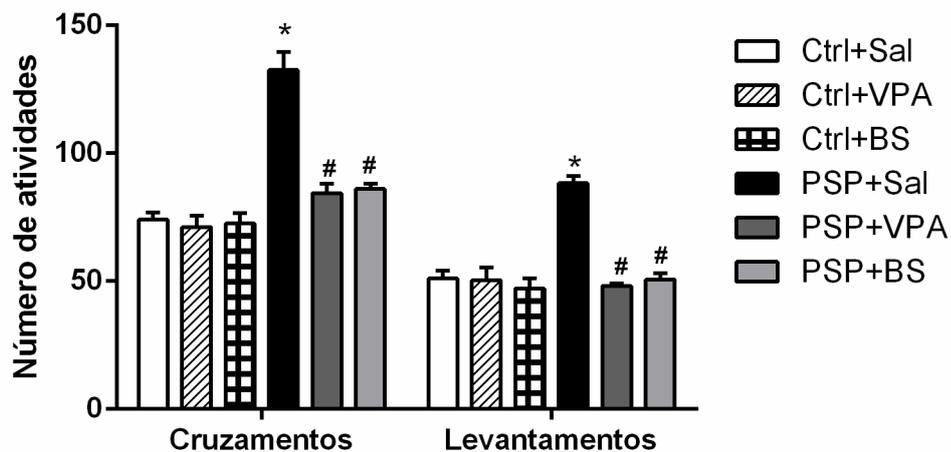


Figura 17: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre o número de cruzamentos e levantamentos, no teste de campo aberto, de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p \leq 0,05$ comparado com o grupo Sal+Sal; #= $p \leq 0,05$ comparado com o grupo PSP+Sal, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

Dados do ANOVA de duas vias para PSP [cruzamentos: $F(1,36) = 64,806$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(1,36) = 23,038$, $p < 0,001$]; para tratamento com BS ou VPA [cruzamentos: $F(2,36) = 21,891$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(2,36) = 26,127$, $p < 0,001$] e para a interação entre PSD vs. tratamento [cruzamentos: $F(2,36) = 18,214$, $p < 0,001$; levantamentos: $F(2,36) = 21,190$, $p < 0,001$].

A atividade de HDAC foi aumentada em todas as estruturas cerebrais após o protocolo de PSP (figura 18). O tratamento com VPA e BS diminuiu a atividade dessa enzima, tanto em camundongos privados como controles. Como demonstrado na figura 19, o protocolo de privação também aumentou a atividade de DNMT no córtex frontal, hipocampo e estriado. VPA e BS *per se* diminuíram a atividade de DNMT comparada com o grupo controle e reverteram a alteração induzida pela PSP. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos experimentais na atividade de HAT (Figura 20).

Dados do ANOVA de duas vias para a PSP [HDAC córtex frontal: $F(1,30) = 3,0414$, $p = 0,091$; HDAC hipocampo: $F(1,30) = 43,0032$, $p < 0,001$; HDAC Estriado: $F(1,30) = 21,9504$, $p < 0,001$; DNMT córtex frontal: $F(1,30) = 47,1128$, $p < 0,001$; DNMT hipocampo: $F(1,30) = 47,5451$, $p < 0,001$; DNMT Estriado: $F(1,30) = 9,0923$, $p < 0,001$]; para tratamento com BS ou VPA [HDAC córtex frontal: $F(2,30) = 213,0127$, $p < 0,001$; HDAC hipocampo: $F(2,30) = 99,4284$, $p < 0,001$; HDAC estriado: $F(2,30) = 73,3411$, $p < 0,001$; DNMT córtex frontal: $F(2,30) = 71,9419$, $p < 0,001$; DNMT hipocampo: $F(2,30) = 39,6006$, $p < 0,001$; DNMT estriado: $F(2,34) = 75,9584$, $p < 0,001$]

e para interação entre PSP vc tratamento [HDAC córtex frontal: $F(2,30)=10,9398$, $p<0,001$; HDAC hipocampo: $F(2,30)=6,3704$, $p=0,004$; HDAC estriado: $F(2,30)=4,5333$, $p=0,019$; DNMT córtex frontal: $F(2,30)=6,1877$, $p=0,005$; DNMT hipocampo: $F(2,30)=1,6693$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(2,30)=9,0923$, $p<0,001$].

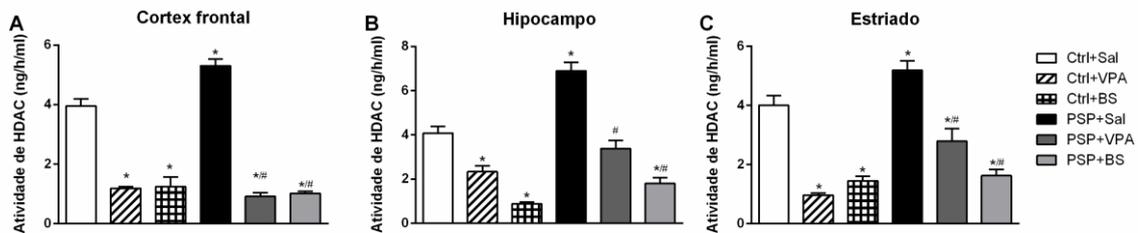


Figura 18: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo Sal+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo d-amph+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

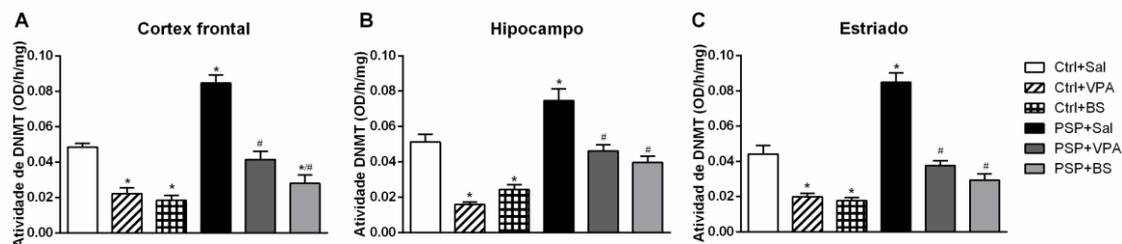


Figura 19: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (B) sobre a atividade de DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo Sal+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo d-amph+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

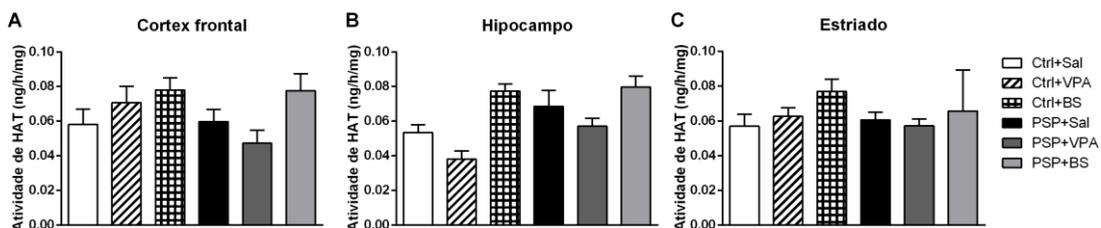


Figura 20: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona Acetiltransferase (HAT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono paradoxal (PSP). As barras representam media \pm erro padrão.

A figura 21 demonstra a correlação entre o número de cruzamento e a atividade de HDAC a atividade de DNMT em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Como pode ser observado, existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o número de cruzamentos vs atividade de HDAC (figura 21A, 21B e 21C) e número de cruzamentos vs atividade de DNMT (figura 21D, 21E e 21F) no

córtex frontal, hipocampo e estriado. A correlação entre atividade de HDAC e atividade de DNMT também está demonstrada na figura 20. Os resultados mostram uma correlação positiva entre atividade de HDAC e atividade de DNMT no córtex frontal (Figura 21G), hipocampo (Figura 21H) e estriado (Figura 21I).

Dados da correlação de Pearson para atividade de HDAC vs número de cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,2876$ (fraca), $p<0,001$; Hipocampo: $r^2=0,4808$ (moderada), $p<0,001$; Estriado: $r^2=0,3118$ (fraca), $p<0,001$]; para atividade de DNMT vs. número de cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,4340$ (moderada), $p<0,001$; Hipocampo: $r^2=0,4033$ (moderada), $p=0,001$; Estriado: $r^2=0,4772$ (moderada), $p<0,001$]; para atividade de HDAC vs atividade de DNMT [córtex frontal: $r^2=0,5781$ (moderada), $p<0,001$; Hipocampo: $r^2=0,4340$ (moderada), $p<0,001$; Estriado: $r^2=0,6122$ (moderada), $p<0,001$].

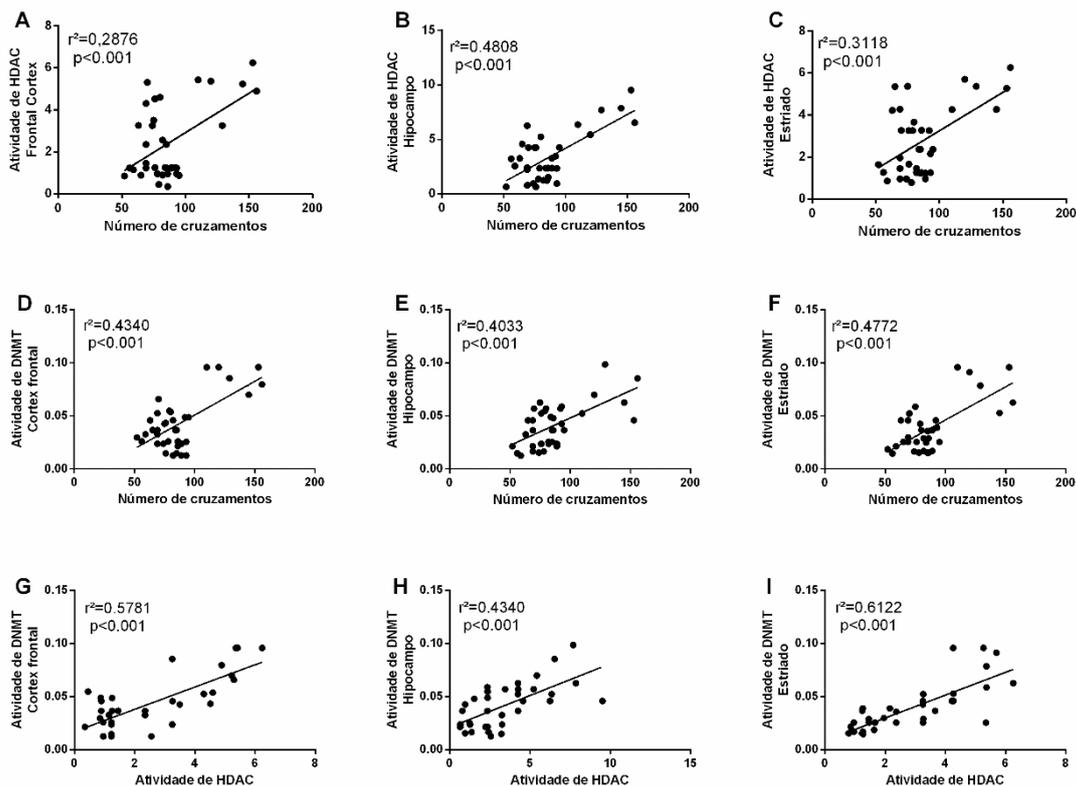


Figura 21: Correlação entre o número de cruzamentos vs atividade de histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C); número de cruzamentos vs atividade de DNA metiltransferase (DNMT) córtex frontal (D), hipocampo (E) e estriado (F); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no córtex frontal (G), hipocampo (H) e estriado (I); de camundongos submetidos ao modelo animal de mania induzido por privação do sono. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

4.3 MODELO ANIMAL DE MANIA INDUZIDO POR OUABAINA

A figura 22 representa os efeitos comportamentais do tratamento com VPA e BS nos animais submetidos ao modelo animal de mania induzido por OUA. A injeção ICV de OUA aumentou o número de cruzamentos e levantamentos comparados com o grupo controle. VPA e BS *per se* não afetaram a atividade locomotora nos animais. Entretanto, o tratamento com os inibidores de HDAC foi capaz de reverter a hiperatividade induzida por OUA.

Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA [cruzamentos: $F(1,36)=54,9276$, $p<0,001$; levantamentos: $F(1,36)=31,3772$, $p<0,001$]; para o tratamento com BS ou VPA [cruzamentos: $F(2,36)=6,9751$, $p=0,002$; levantamentos: $F(2,36)=29,9203$, $p<0,001$] e para interação entre administração de OUA vs tratamento [cruzamentos: $F(2,36)=11,5309$, $p<0,001$; levantamentos: $F(2,36)=20,3448$, $p<0,001$].

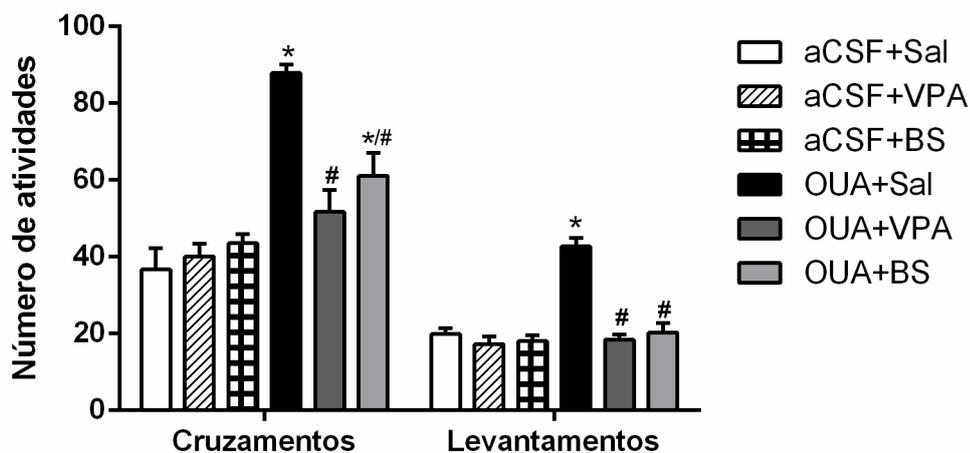


Figura 22: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre o número de cruzamentos e levantamentos no teste de campo aberto de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p\leq 0,05$ comparado ao grupo aCSF+Sal; #= $p\leq 0,05$ comparado com o grupo OUA+Sal, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

A administração de OUA não alterou a atividade de HDAC (figura 23), DNMT (figura 24) ou HAT (figura 25) em nenhuma das estruturas cerebrais analisadas. O tratamento com VPA e BS diminuíram a atividade de HDAC e DNMT tanto nos animais que receberam injeção ICV de aCSF quanto nos animais que receberam injeção ICV de OUA. A atividade de HAT não foi afetada pelo tratamento com inibidores de HDAC.

Dados do ANOVA de duas vias para a administração de OUA [HDAC córtex frontal: $F(1,36)=3,3499$, $p=0,075$; HDAC hipocampo: $F(1,36)=0,0358$, $p=0,850$;

HDAC estriado: $F(1,36)=2,1198$, $p=0,111$; DNMT córtex frontal: $F(1,36)=0,1511$, $p=0,699$; DNMT hipocampo: $F(1,36)=0,0063$, $p=0,937$; DNMT estriado: $F(1,36)=0,4235$, $p=0,0519$]; Para o tratamento com BS ou VPA [HDAC córtex frontal: $F(2,36)=62,9303$, $p<0,001$; HDAC hipocampo: $F(2,36)=43,0626$, $p<0,001$; HDAC estriado: $F(2,36)=53,8193$, $p<0,001$; DNMT córtex frontal: $F(2,36)=37,8854$, $p<0,001$; DNMT hipocampo: $F(2,36)=17,7110$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(2,36)=18,5303$, $p<0,001$] e para interação entre administração de OUA vs tratamentos [HDAC córtex frontal: $F(2,36)=0,9001$, $p=0,415$; HDAC hipocampo: $F(2,36)=3,7741$, $p=0,032$; HDAC estriado: $F(2,36)=2,8018$, $p=0,073$; DNMT córtex frontal: $F(2,36)=0,0261$, $p=0,974$; DNMT hipocampo: $F(2,36)=0,2007$, $p=0,819$; DNMT estriado: $F(2,36)=0,5761$, $p=0,567$].

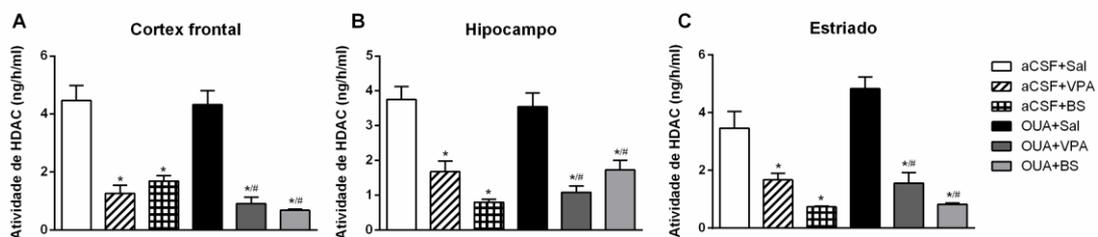


Figura 23: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo aCSF+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo OUA+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

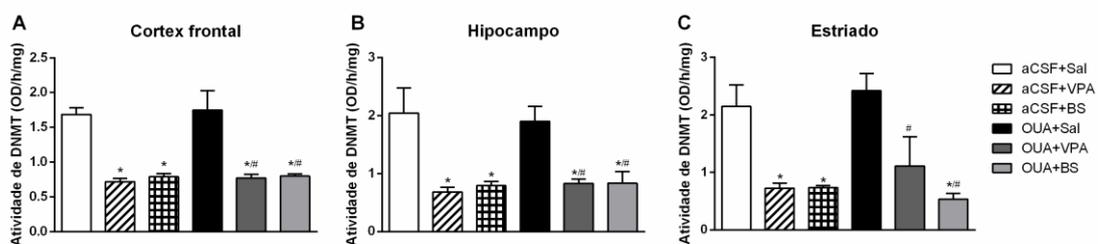


Figura 24: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo aCSF+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo OUA+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

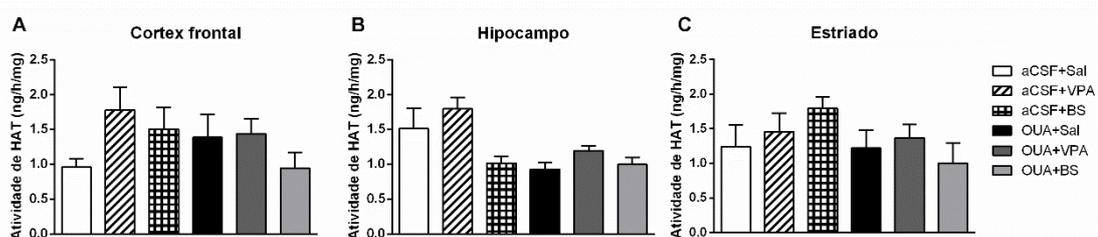


Figura 25: Efeitos do valproato (VPA) e do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona acetiltransferase (HAT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao

modelo animal de mania induzido por ouabaína (OUA). As barras representam média e barras de erro representam \pm erro padrão.

A figura 26 demonstra a correlação entre o número de cruzamentos e a atividade de HDAC e atividade de DNMT em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Como pode ser observado, existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o número de cruzamentos e a atividade de HDAC no estriado (figura 26C), mas não no córtex frontal (Figura 26A) e hipocampo (Figura 26B). Não há correlação significativa entre o número de cruzamentos vs a atividade de DNMT no córtex frontal (figura 26D), hipocampo (figura 26E) ou estriado (figura 26F). A correlação entre atividade de HDAC e atividade de DNMT também é demonstrada na figura 26. Os dados demonstram uma correlação positiva entre atividade de HDAC e atividade de DNMT no córtex frontal (figura 26G), hipocampo (figura 26H) e estriado (Figura 26I).

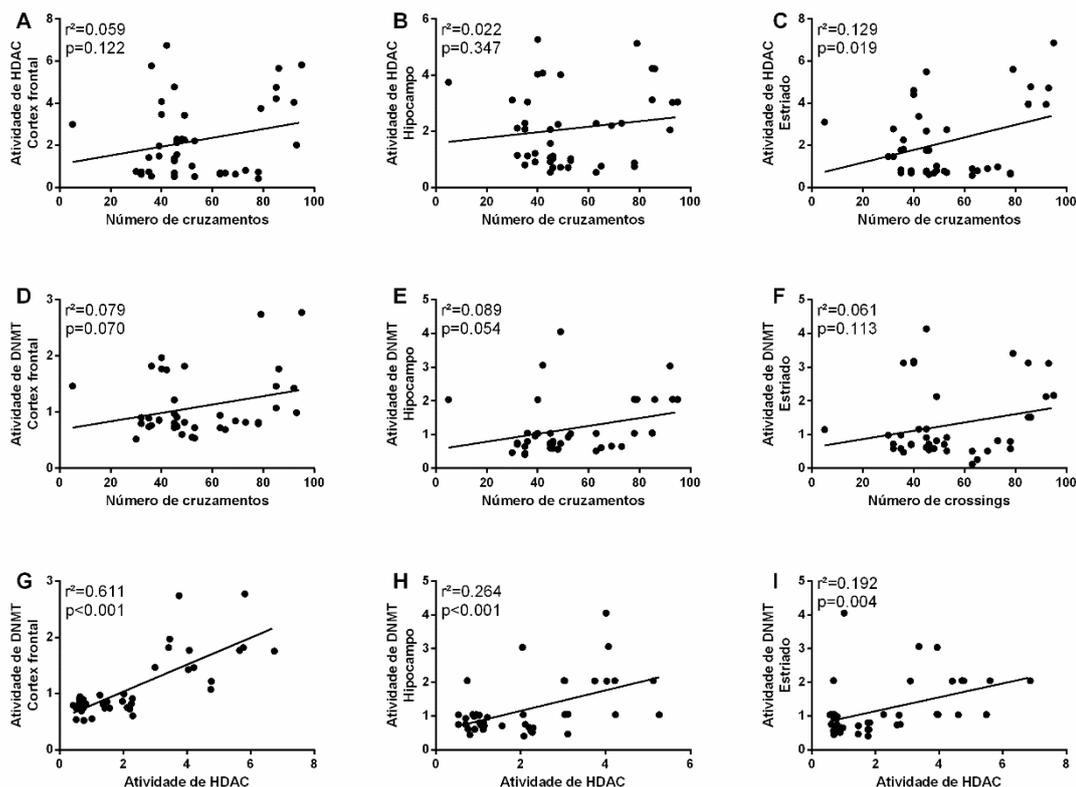


Figura 26: Correlação entre o número de cruzamentos vs atividade de histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C); número de cruzamentos vs atividade de DNA metiltransferase (DNMT) córtex frontal (D), hipocampo (E) e estriado (F); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no córtex frontal (G), hipocampo (H) e estriado (I); de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

Dados da correlação de Pearson para atividade de HDAC vs número de cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,05865$, $p<0,1223$; hipocampo: $r^2=0,02210$, $p=$

0,3474; striatum: $r^2=0,1289$ (fraca), $p<0,0195$]; para atividade de DNMT vs number of cruzamentos [córtex frontal: $r^2=0,07962$, $p=0,0702$; Hipocampo: $r^2=0,08979$, $p=0,0539$; estriado: $r^2=0,06146$, $p<0,1134$]; para atividade de HDAC vs atividade de DNMT [córtex frontal: $r^2=0,6104$ (moderada), $p<0,001$; hipocampo: $r^2=0,2637$ (fraca), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,1916$ (fraca), $p<0,0037$].

4.4 MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR PRIVAÇÃO MATERNA

Os efeitos comportamentais do tratamento com BS nos animais submetidos ao modelo animal de depressão induzido por PM estão demonstrados da figura 27. O protocolo de PM aumentou o tempo de imobilidade e reduziu o tempo de natação no teste de nado forçado quando comparado ao grupo controle. O tratamento com BS *per se* não alterou nenhum desses parâmetros. Entretanto, a administração desse inibidor foi capaz de reverter parcialmente as alterações causadas no tempo de imobilidade e totalmente o tempo de nado.

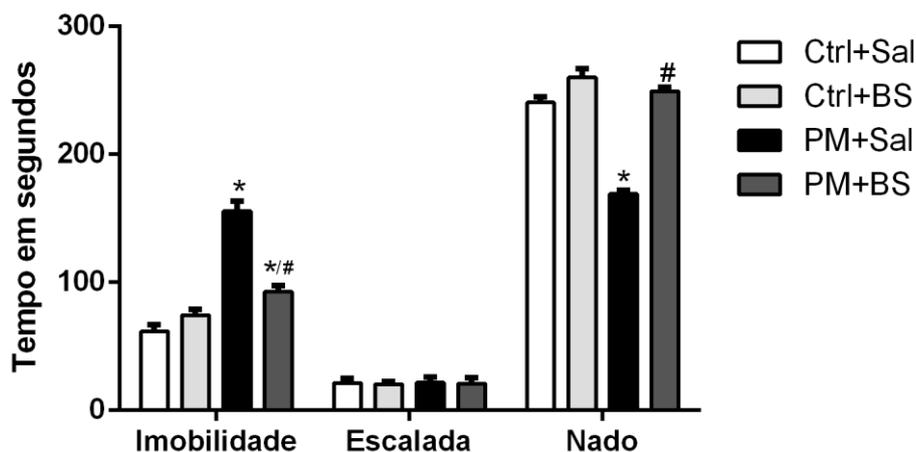


Figura 27: Efeitos butirato de sódio (BS) sobre o tempo de imobilidade, a escalada e o nado, no teste de nado forçado, de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p\leq 0,05$ comparado ao grupo Ctrl+Sal; #= $p\leq 0,05$ comparado com o grupo PM+Sal, de acordo com o ANOVA de duas vias seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

Dados do ANOVA de duas vias para o protocolo de PM [imobilidade: $F(1,24)=57,818$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=79,48$, $p<0,001$]; para o tratamento com BS [imobilidade: $F(1,24)=172,297$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=116,93$, $p<0,001$] e para interação entre PM vs tratamento [imobilidade: $F(1,24)=8857,3$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=43,72$, $p<0,001$].

O protocolo de PM aumentou a atividade de HDAC no hipocampo e no estriado, mas não no córtex frontal dos animais adultos (figura 28). O tratamento com BS *per se* diminuiu a atividade dessa enzima no hipocampo e estriado quando

comparados ao grupo controle. Nos animais privados, o BS foi capaz de reverter a alteração da atividade de HDAC causada no hipocampo e estriado. Assim como a atividade de HDAC, o protocolo de PM causou aumento de DNMT apenas no hipocampo e estriado, e o tratamento com BS diminuiu a atividade dessa enzima em ambos os grupos, privados e não privados quando comparados com o grupo controle (figura 29). Interessantemente, a atividade de HAT também não foi alterada em nenhum grupo experimental, exceto no córtex frontal do grupo não privado + BS, onde houve uma diminuição da atividade dessa enzima (figura 30).

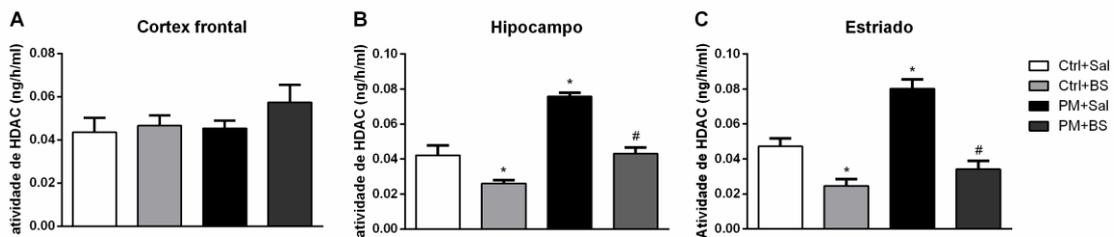


Figura 28: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM). Barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo Ctrl+Sal; #= $p < 0,05$ comparado com o grupo PM+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

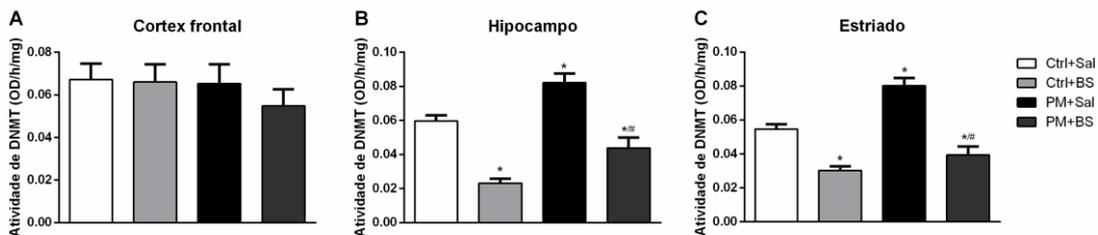


Figura 29: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM). Barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo Ctrl+Sal; #= $p < 0,05$ comparado com o grupo PM+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

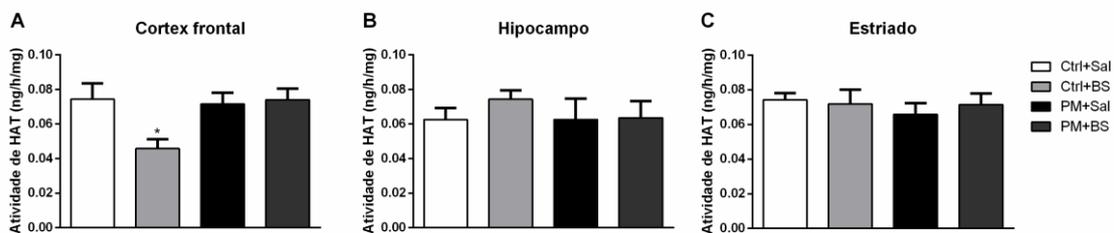


Figura 30: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona acetiltransferase (HAT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por privação materna (PM). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p < 0,05$ comparado com o grupo Ctrl+Sal.

Dados do ANOVA de duas vias para o protocolo de PM [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=1,0923$, $p=0,311$; HDAC hipocampo: $F(1,16)=47,6967$, $p < 0,001$; HDAC

estriado: $F(1,16)=21,0822$, $p<0,001$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=0,6443$, $p=0,434$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=22,0387$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(1,16)=20,2515$, $p<0,001$]; Para o tratamento com BS [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=1,5481$, $p=0,231$; HDAC hipocampo: $F(1,16)=44,7280$, $p<0,001$; HDAC estriado: $F(1,16)=54,6696$, $p<0,001$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=0,4976$, $p=0,491$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=66,0727$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(1,16)=71,0876$, $p<0,001$] e para interação entre PM vs tratamento [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=0,5573$, $p=0,466$; HDAC hipocampo: $F(1,16)=5,1334$, $p<0,038$; HDAC estriado: $F(1,16)=6,3611$, $p<0,05$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=0,3130$, $p=0,583$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=0,0472$, $p=0,831$; DNMT estriado: $F(1,16)=4,4977$, $p<0,05$].

A figura 31 demonstra a correlação entre o tempo de imobilidade e a atividade de HDAC a atividade de DNMT em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Como pode ser observado, existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o tempo de imobilidade vs atividade de HDAC e tempo de imobilidade vs atividade de DNMT no hipocampo (figura 31B e 31E) e estriado (figura 31C e 31F), mas não no córtex frontal (figura 31A e 31D). A correlação entre atividade de HDAC e atividade de DNMT também está demonstrada na figura 31. Os resultados mostram uma correlação positiva entre atividade da HDAC e atividade da DNMT no hipocampo (Figura 31H) e estriado (Figura 31I), mas não no córtex frontal (Figura 31G).

Dados da correlação de Pearson para atividade de HDAC vs tempo de imobilidade [córtex frontal: $r^2=0,01916$, $p=0,5606$; hipocampo: $r^2=0,6508$ (moderada), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,7218$ (forte), $p<0,001$]; para atividade de DNMT vs tempo de imobilidade [córtex frontal: $r^2=0,02377$, $p=0,5163$; Hipocampo: $r^2=0,5226$ (moderada), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,7035$ (forte), $p<0,001$]; para atividade de HDAC vs atividade de DNMT [córtex frontal: $r^2=0,004776$, $p=0,7722$; hipocampo: $r^2=0,6439$ (moderada), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,7154$ (forte), $p<0,001$].

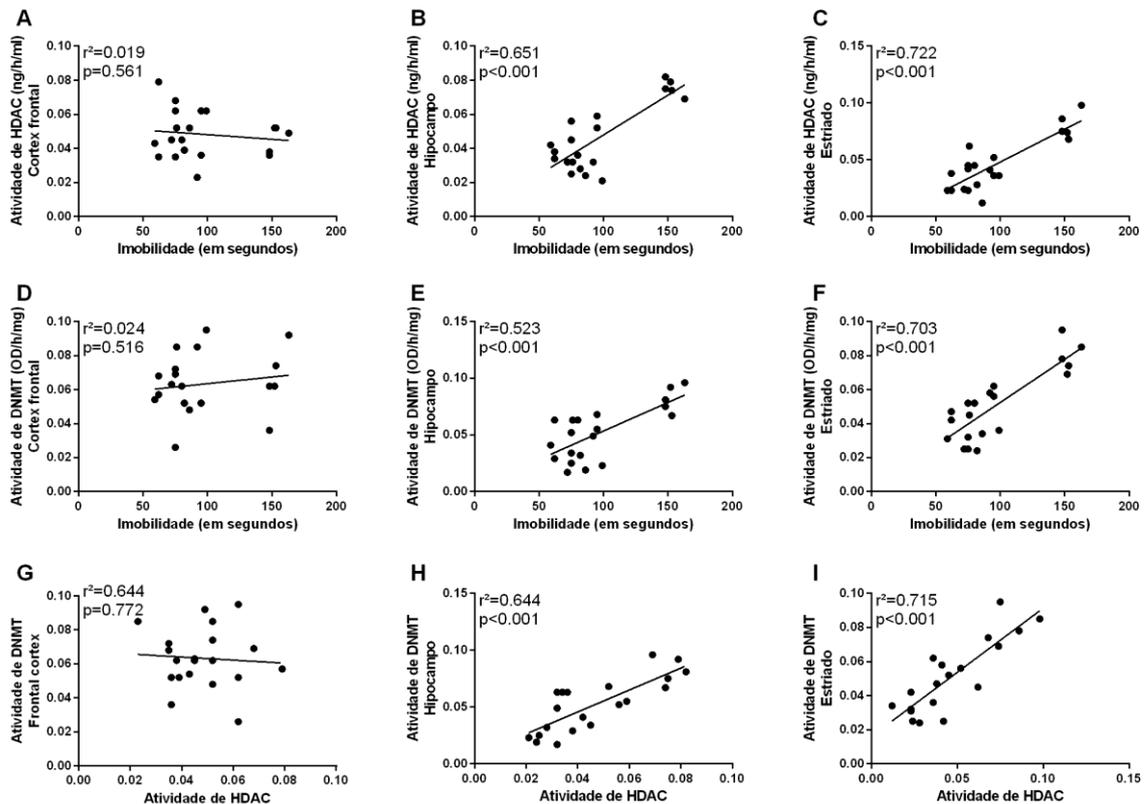


Figura 31: Correlação entre o tempo de imobilidade vs atividade de histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C); tempo de imobilidade vs atividade de DNA metiltransferase (DNMT) córtex frontal (D), hipocampo (E) e estriado (F); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no córtex frontal (G), hipocampo (H) e estriado (I); de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por privação materna. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

4.5 MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDO POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO

A figura 32 representa os efeitos do tratamento com BS sobre o comportamento do tipo depressivo no teste de nado forçado de animais submetidos ao modelo animal de depressão induzido por ECM. A exposição dos animais ao ECM aumentou o tempo de imobilidade e diminuiu o tempo de nado dos animais comparados com o grupo controle. A administração do BS *per se* não alterou nenhum desses parâmetros, entretanto, foi capaz de reverter parcialmente as alterações causadas pelo ECM tanto para o parâmetro de imobilidade, quanto para o parâmetro de nado.

Dados do ANOVA de duas vias para o protocolo de ECM [imobilidade: $F(1,24)=94,912$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=75,731$, $p<0,001$]; para o tratamento com BS [imobilidade: $F(1,24)=18,724$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=14,148$, $p<0,001$] e para

interação entre PM vs tratamento [imobilidade: $F(1,24)=42,612$, $p<0,001$; nado: $F(1,24)=34,786$, $p<0,001$].

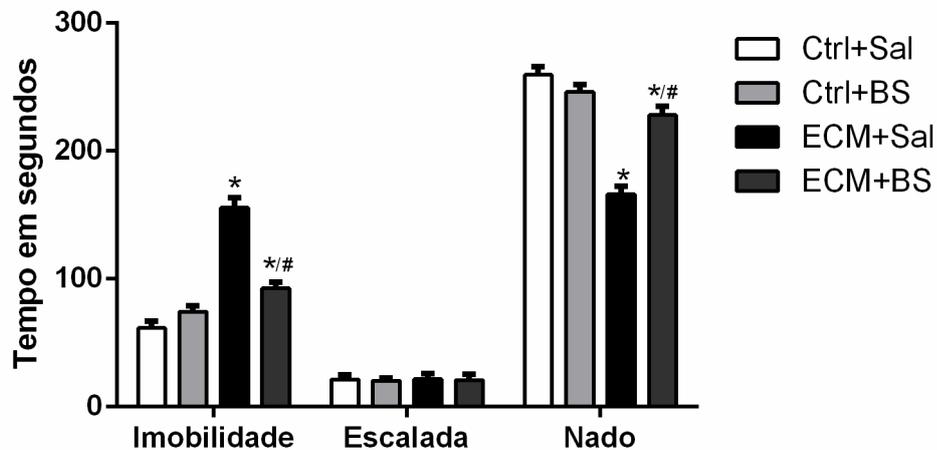


Figura 32: Efeitos butirato de sódio (BS) sobre o tempo de imobilidade, escalada e nado no teste de nado forçado de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado. As barras representam media \pm erro padrão; *= $p\leq 0,05$ comparado ao grupo Ctrl+Sal; #= $p\leq 0,05$ comparado com o grupo ECM+Sal, de acordo com o ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

O protocolo de ECM aumentou a atividade de HDAC em todas as estruturas cerebrais avaliadas. O tratamento com BS *per se* não alterou a atividade dessa enzima quando comparados ao grupo controle, entretanto, foi capaz de reverter esse aumento causado pelo ECM no córtex frontal e hipocampo (figura 33). Assim como a atividade de HDAC, o protocolo de ECM causou aumento de DNMT em todas as estruturas. O tratamento com BS não alterou a atividade dessa enzima no grupo controle mas reverteu totalmente o aumento da atividade de DNMT causado pelo ECM no córtex frontal e estriado, e reverteu parcialmente no hipocampo (figura 34). A atividade de HAT não foi alterada em nenhum grupo experimental em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas (figura 35).

Dados do ANOVA de duas vias para o protocolo de PM [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=22,5716$, $p<0,001$; HDAC hipocampo: $F(1,16)=21,6733$, $p<0,001$; HDAC estriado: $F(1,16)=15,4342$, $p<0,05$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=17,6539$, $p<0,001$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=3,027$, $p<0,101$; DNMT estriado: $F(1,16)=12,3640$, $p<0,05$]; Para o tratamento com BS [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=9,06721$, $p<0,05$; HDAC hipocampo: $F(1,16)=18,2525$, $p<0,001$; HDAC estriado: $F(1,16)=1,3113$, $p<0,269$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=12,5396$, $p=0,001$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=73,777$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(1,16)=1,9987$, $p<0,176$] e para interação entre ECM vs tratamento [HDAC córtex frontal: $F(1,16)=4,4900$, $p=0,051$; HDAC

hipocampo: $F(1,16)=3,3125$, $p=0,087$; HDAC estriado: $F(1,16)=4,1046$, $p=0,059$; DNMT córtex frontal: $F(1,16)=12,0252$, $p<0,05$; DNMT hipocampo: $F(1,16)=29,005$, $p<0,001$; DNMT estriado: $F(1,16)=7,0026$, $p<0,05$].

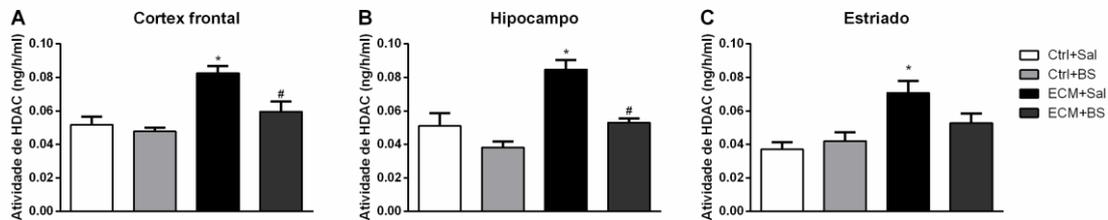


Figura 33: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo Ctrl+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo PM+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

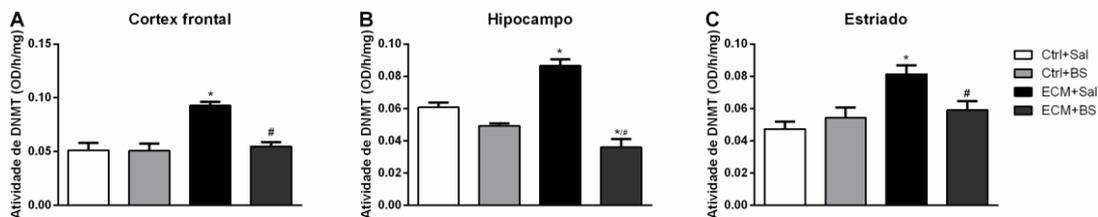


Figura 34: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de DNA metiltransferase (DNMT) no córtex frontal (A), no hipocampo (B) e no estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado (ECM). As barras representam média \pm erro padrão; *= $p<0,05$ comparado com o grupo Ctrl+Sal; #= $p<0,05$ comparado com o grupo PM+Sal, de acordo com ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey.

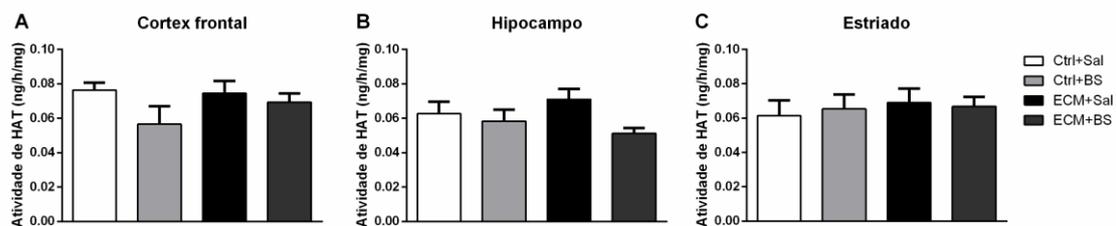


Figura 35: Efeitos do butirato de sódio (BS) sobre a atividade de Histona acetiltransferase (HAT) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C) de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado. As barras representam média \pm erro padrão.

A figura 36 demonstra a correlação entre o tempo de imobilidade e a atividade de HDAC e a atividade de DNMT em todas as estruturas cerebrais avaliadas. Como pode ser observado, existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre o número de cruzamentos vs atividade da HDAC (figura 36A, 36B e 36C) e número de cruzamentos vs atividade da DNMT (figura 36D, 36E e 36F) no córtex frontal, hipocampo e estriado. A correlação entre atividade de HDAC e atividade de DNMT também está demonstrada na figura 36. Os resultados mostram uma

correlação positiva entre atividade da HDAC e atividade da DNMT no córtex frontal (Figura 36G), hipocampo (Figura 36H) e estriado (Figura 36I).

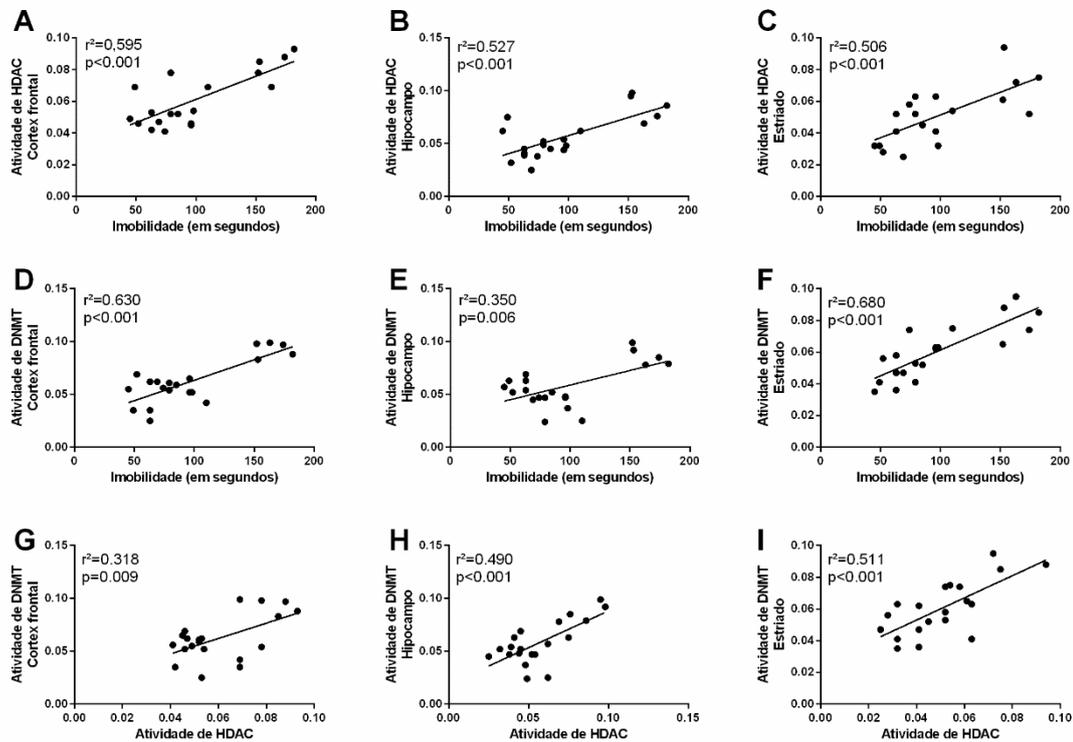


Figura 36: Correlação entre o tempo de imobilidade vs atividade de histona desacetilase (HDAC) no córtex frontal (A), hipocampo (B) e estriado (C); tempo de imobilidade vs atividade de DNA metiltransferase (DNMT) córtex frontal (D), hipocampo (E) e estriado (F); atividade de HDAC vs atividade de DNMT no córtex frontal (G), hipocampo (H) e estriado (I); de ratos submetidos ao modelo animal de depressão induzido por estresse crônico moderado. Os dados foram analisados pelo teste de correlação de Pearson.

Dados da correlação de Pearson para atividade de HDAC vs tempo de imobilidade [córtex frontal: $r^2=0,5949$ (moderada), $p<0,001$; hipocampo: $r^2=0,5274$ (moderada), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,5063$ (moderada), $p<0,001$]; para atividade de DNMT vs tempo de imobilidade [córtex frontal: $r^2=0,6303$ (moderada), $p<0,001$; Hipocampo: $r^2=0,3496$ (fraca), $p<0,05$; estriado: $r^2=0,6798$ (moderada), $p<0,001$]; para atividade de HDAC vs atividade de DNMT [córtex frontal: $r^2=0,3184$ (fraca), $p<0,05$; hipocampo: $r^2=0,4903$ (moderada), $p<0,001$; estriado: $r^2=0,5115$ (moderada), $p<0,001$].

Os resultados da atividade enzimática dos modelos animais de mania e depressão estão sumarizados na tabela 3, enquanto os resultados das análises de correlação dos modelos animais de mania e depressão estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 3: Compilação dos resultados de atividade enzimática, comparados com o grupo controle dos respectivos modelos animais de mania ou depressão. ‘^’= aumento, ‘v’= redução, ‘=’= sem alteração

		Atividade de HDAC			Atividade de DNMT			Atividade de HAT		
		CF	HIP	EST	CF	HIP	EST	CF	HIP	EST
d-amph	Sal+VPA	v	v	v	=	=	=	=	=	=
	Sal+BS	v	v	v	=	v	=	=	=	=
	amph	=	^	^	^	^	^	=	=	=
	amph+VPA	=	v	=	=	=	=	=	=	=
	amph+BS	v	v	v	=	=	=	=	=	=
PSP	Ctrl+VPA	v	v	v	v	v	v	=	=	=
	Ctrl+BS	v	v	v	v	v	v	=	=	=
	PSP	^	^	^	^	^	^	=	=	=
	PSP+VPA	v	=	v	=	=	=	=	=	=
	PSP+BS	v	v	v	v	=	=	=	=	=
OUA	aCSF+VPA	v	v	v	v	v	v	=	=	=
	aCSF+BS	v	v	v	v	v	v	=	=	=
	OUA	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	OUA+VPA	v	v	v	v	v	=	=	=	=
	OUA+BS	v	v	v	v	v	v	=	=	=
PM	Ctrl+BS	=	v	v	=	v	v	v	=	=
	PM+Sal	=	^	^	=	^	^	=	=	=
	PM+BS	=	=	=	=	v	v	=	=	=
ECM	Ctrl+BS	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	ECM+Sal	^	^	^	^	^	^	=	=	=
	ECMM+BS	=	=	=	=	v	=	=	=	=

Tabela 4: Compilação dos resultados da força de correlação entre as variáveis dos modelos animais de mania e depressão.

		Atividade de HDAC			Atividade de DNMT		
		CF	HIP	EST	CF	HIP	EST
d-amph	Cruzamento	Moderada	Muito fraca	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
	DNMT	Moderada	Moderada	Moderada	-	-	-
PSP	Cruzamento	Fraca	Moderada	Fraca	Moderada	Moderada	Moderada
	DNMT	Moderada	Moderada	Moderada	-	-	-
OUA	Cruzamento	Ausente	Ausente	Muito fraca	Ausente	Ausente	Ausente
	DNMT	Moderada	Fraca	Muito fraca	-	-	-
PM	Imobilidade	Ausente	Moderada	Forte	Ausente	Moderada	Forte
	DNMT	Ausente	Moderada	Forte	-	-	-
ECM	Imobilidade	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Fraca	Moderada
	DNMT	Fraca	Moderada	Moderada	-	-	-

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a administração repetida de d-amph foi capaz de induzir um estado hiperativo nos ratos, através do aumento no número de cruzamentos e levantamentos, quando comparado com o grupo controle. As Amphs, de uma forma geral, agem no cérebro como ativadoras do sistema dopaminérgico, aumentando a liberação de dopamina e diminuindo a recaptação desse neurotransmissor (Perugi et al., 2017). Muitas evidências sugerem que a administração crônica de amph pode induzir uma gama de comportamentos do tipo maníaco em roedores, sendo considerado um bom modelo animal de mania (Minassian et al., 2016). O tratamento com os inibidores de HDAC, VPA e BS, foi capaz de diminuir a hiperatividade induzida pela d-amph nos animais. Esse modelo animal responde a agentes farmacológicos clássicos utilizados na clínica, como Li e VPA, essa característica faz da administração crônica de amph uma importante ferramenta para investigar a eficácia de novas substâncias para o tratamento da mania bipolar (Zhou et al., 2015). Alguns estudos pré-clínicos tem demonstrado que o BS apresenta efeitos antimaníacos no modelo animal de mania induzido pela administração de amph (Resende et al., 2013; Steckert et al., 2013; Valvassori et al., 2018).

O protocolo de PSP também foi capaz de aumentar o número de cruzamentos e levantamentos nos camundongos, quando comparados com os animais do grupo controle. Os modelos animais ambientais têm sido considerados ótimas ferramentas para os estudos pré-clínicos na área da psiquiatria, uma vez que esses modelos são baseados em potenciais características etiológicas desses transtornos (Nestler e Hyman, 2010; Beyer e Freund, 2017). A perturbação do relógio circadiano resulta em alterações do humor e indução de mania em pacientes bipolares, o que pode ser o principal mecanismo pelo qual o protocolo de PSP induz comportamentos do tipo maníacos em roedores (Beyer and Freund, 2017). A administração de VPA e BS foi capaz de reverter as alterações comportamentais induzidas pela PSP em camundongos. Esses resultados corroboram com a literatura, que demonstra que o protocolo de privação pode responder à administração de estabilizadores do humor (Valvassori et al., 2017b).

A injeção ICV de ouabaína também induziu alteração nas atividades locomotoras e exploratória dos animais. Como descrito previamente, a OUA age como um inibidor da Na^+/K^+ ATPase e, o efeito inibitório dessa enzima induz a

excitabilidade neuronal, através do prolongamento do estado de despolarização da membrana neuronal (McCarren e Alger, 1989; El-Mallakh et al., 1995; Herman et al., 2007). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que alterações na sinalização da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ provocam mudanças em vários domínios comportamentais, como a atividade locomotora, a memória e o aprendizado, as respostas a estímulos aversivos e o comportamento social (Lichtstein et al., 2018). A hipótese do envolvimento da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ na fisiopatologia do TB foi proposta há muito tempo por El-Mallakh e Wyatt (1995). Looney e El-mallakh (1997) demonstraram em uma meta-análise que a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ está diminuída em eritrócitos de pacientes bipolares durante episódios maníacos e depressivos, quando comparados com pacientes eutímicos. Desde então, outros estudos têm contribuído para essa hipótese (Mynett-Johnson et al., 1998; Rose et al., 1998; Goldstein et al., 2009; Kurup e Kurup, 2012), ressaltando o envolvimento dessa enzima na fisiopatologia do TB e reforçando a sua relevância como validade de constructo para modelos animais de mania.

É bem descrito que a microinjeção de OUA pode induzir diversos comportamentos do tipo maníaco em animais e essas alterações são revertidas por fármacos antimaníacos, como o Li e o VPA (Jornada et al., 2011; Valvassori et al., 2017c). No presente estudo, o tratamento com VPA e BS foram capazes de reverter a hiperatividade induzida por OUA. Embora a literatura apresente resultados um pouco controversos, os efeitos dos inibidores de HDAC na modulação de comportamentos motivados como alimentação, agressividade e busca por drogas parecem ser via mecanismos de neuroplasticidade em regiões dopaminérgicas como estriado e córtex frontal (Elvir et al., 2017). Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou que VPA e BS foram capazes de reverter o comportamento do tipo maníaco e aumentar níveis de BDNF, fator de crescimento neural (NGF – do inglês *Nerve Growth Factor*) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF – do inglês *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) no hipocampo e no estriado de ratos (Varela et al., 2015). Juntamente com os resultados do presente estudo, esses dados apontam para a modulação neurotrófica, através de mecanismos epigenéticos como um dos mecanismos pelo qual os inibidores de HDAC revertem comportamento do tipo maníaco.

Evidências tem sugerido que os moduladores epigenéticos podem alterar cognição e comportamento (Machado-Vieira et al., 2011). Diversos estudos têm

demonstrado que os inibidores da HDAC, VPA e BS, apresentam efeitos antimaníacos e antidepressivos em estudos pré-clínicos (Resende et al., 2013). Juntos, esses resultados sugerem que a modulação da HDAC pode ter um importante papel na modulação comportamental nos transtornos de humor; entretanto, os mecanismos exatos por trás desses efeitos e a interação dessas substâncias com outros marcadores epigenéticos ainda não estão completamente elucidados (Peedicayil, 2014).

A administração repetida de d-amph foi capaz de aumentar a atividade de HDAC no hipocampo e estriado, mas não no córtex frontal dos ratos. Apesar de parecer que as modificações das histonas têm um papel nas alterações comportamentais induzidas por psicoestimulantes, os dados na literatura sobre o papel específico da HDAC ainda são controversos. Shibasaki et al. (2011) demonstraram que a administração crônica de meta-amph em ratos aumenta os níveis de acetilação da histona H3 no prosencéfalo límbico de camundongos. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado que a administração crônica de amph foi capaz de aumentar a atividade de HDAC no córtex frontal de ratos (Stertz et al., 2014) e expressão da HDAC5 no septo lateral e estriado de camundongos (Liu e Liu, 2016). Outro estudo demonstrou que uma única injeção i.p. de meta-amph não alterou atividade da HDAC no córtex frontal, no hipocampo, no estriado e na amígdala de ratos Wistar (Arent et al., 2011). Martin et al. (2012) mostraram que uma única injeção de meta-amph foi capaz de diminuir os níveis de HDAC1 e aumentar os níveis de HDAC2 no núcleo *accumbens* de ratos. Esses dados sugerem que os efeitos da d-amph sobre a atividade de HDAC parecem ser dependentes da dose e da região cerebral avaliada, o que poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos específicos das estruturas cerebrais do presente estudo. O tratamento com BS diminuiu a atividade basal de HDAC no cérebro de animais que receberam tanto salina quanto d-amph. Entretanto, o VPA não teve efeito sobre a atividade de HDAC no córtex frontal dos animais que receberam d-amph, e apenas reverteu o aumento induzido por d-amph no estriado. A discrepância dos efeitos de VPA e BS podem estar relacionados aos alvos específicos de cada substância. Embora os dois sejam inibidores da HDAC, BS possui um efeito mais substancial, agindo sobre as classes de HDAC I e IV, enquanto VPA age apenas na classe I (Ganguly e Seth, 2018).

Os dados na literatura sobre os níveis, expressão e atividade da DNMT, após a administração de d-amph também são discrepantes. Numachi et al. (2004)

descreveram que a expressão da DNMT2 diminuiu 24 horas após uma única injeção de meta-amph (4mg/kg). Mais tarde, Numachi et al. (2007) compararam os efeitos da meta-amph em duas linhagens diferentes de ratos e descobriram que a administração aguda e crônica de meta-amph aumentou a expressão da DNMT1 no núcleo caudado de ratos Fisher, mas diminuiu em ratos Lewis. O efeito foi o oposto no hipocampo, diminuindo expressão de DNMT1 nos ratos Fisher e aumentando nos ratos Lewis. O presente estudo demonstrou que o tratamento repetido de d-amph foi capaz de aumentar a atividade da DNMT no córtex frontal, hipocampo e estriado. Esses resultados sugerem que os efeitos da amph sobre a atividade de DNMT podem variar de acordo com a dose, região cerebral e, até mesmo, linhagem dos animais. A administração de VPA e BS foram capazes de reverter essa alteração induzida pela d-amph na atividade da DNMT. Apesar da associação dos inibidores da HDAC e agentes metiladores terem sido estudadas na área de pesquisa do câncer (Zhu e Otterson, 2003), os efeitos dos inibidores de HDAC sobre a atividade da DNMT ainda são pouco conhecidos. Fuks et al (2000) descreveram que DNMT1 interage com HDAC1 em um nível molecular e, a atividade desacetilase associada com a DNMT1 pode ser necessária para que a DNMT1 exerça suas funções de metilação. Outros estudos também demonstraram que os inibidores de HDAC diminuíram os níveis proteicos da DNMT1 através da degradação mediada pela via proteasomal em células de câncer de mama (Yang et al., 2001; Zhou et al., 2008). Como VPA e BS agem inibindo a HDAC1, esse poderia ser o mecanismo pelo qual essas substâncias inibem a atividade da DNMT. Por outro lado, um estudo prévio demonstrou que o tratamento crônico com VPA diminuiu a metilação do DNA, apesar de não alterar os níveis da DNMT1 ou DNMT3a no hipocampo de camundongos (Aizawa e Yamamuro, 2015).

A atividade de HAT não foi alterada em nenhum grupo experimental no modelo de mania induzido por d-amph. O papel da HAT nos efeitos da d-amph ainda não é completamente conhecido, uma vez que os estudos focados nessa enzima epigenética são extremamente escassos (Ganguly e Seth, 2018). Martin et al., (2012) demonstraram que uma única injeção de meta-amph em uma maior dose (20mg/kg) aumentou a expressão de ATF2, um tipo de HAT, no núcleo *accumbens* de ratos. A discrepância desses resultados pode ser explicada por diferenças metodológicas, como o tipo de amph, a dose e a duração do tratamento.

O protocolo de PSP também aumentou a atividade de HDAC no córtex frontal, no hipocampo e no estriado, mas a atividade da HAT não foi alterada em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas. Seguindo os resultados do presente trabalho, Duan et al. (2016) demonstraram que 72 horas de privação do sono foi capaz de induzir dano cognitivo e aumentar a expressão da HDAC2 no hipocampo de ratos. Interessantemente, o mesmo estudo mostrou que a privação do sono diminuiu a expressão de proteína de ancoragem de CREB (CBP – do inglês *CREB-binding protein*), uma família de proteínas com atividade HAT. Existem 20 tipos de proteínas HAT conhecidas, as quais podem ser classificadas em 5 famílias diferentes, sendo a CBP uma das três menores famílias (Gaine et al., 2018). O método de análise utilizado no presente estudo avalia a atividade da HAT global não especificada, o que pode explicar a diferença entre esses estudos. O VPA e BS foram capazes de diminuir a atividade de ambos os grupos, controle e PSP. Duan et al. (2016) também demonstraram que a tricostatina A, outro inibidor da HDAC, reverteu a diminuição de acetilação da lisina 9 da histona 3 e lisina 12 da histona 4, induzida pela privação do sono, demonstrando o possível papel da inibição da HDAC no tratamento dos efeitos comportamentais da privação do sono.

A PSP também aumentou a atividade da DNMT no cérebro dos ratos e o tratamento com inibidores da HDAC foi capaz de diminuir essa atividade em ambos os grupos, controle e PSP. Em concordância com os presentes resultados, algumas evidências têm sugerido que a privação do sono pode afetar a atividade da DNMT (Sterner e Berger et al., 2000). A privação aguda do sono aumenta a expressão gênica de *Dnmt3a1* e *Dnmt3a2* no córtex anterior de camundongos (Massart et al., 2014). Além disso, 96 horas de PSP em ratos também aumentou a expressão de genes relacionados aos processos de metilação em amostras de cérebro total (Narwade et al., 2017).

É interessante notar que apesar de induzir comportamentos do tipo maníaco, a administração de OUA não alterou atividade da HDAC, HAT e DNMT em nenhuma das regiões cerebrais avaliadas. Os efeitos da administração de OUA sobre as enzimas epigenéticas não foi descrito na literatura até o momento; entretanto, Arent et al. (2011) descreveram que uma única injeção de meta-amph foi capaz de induzir hiperlocomoção em ratos, apesar de não afetar a atividade da HDAC no cérebro. No mesmo estudo, uma única injeção intracerebral de VPA ou BS na amígdala, no córtex frontal e no estriado reverteram a hiperlocomoção induzida por meta-amph. O

tratamento com VPA e BS foi capaz de diminuir a atividade da HDAC e DNMT. Estudos prévios têm demonstrado que a inibição de HDAC reverte o comportamento do tipo maníaco induzido pela OUA; além de reverter importantes marcadores como o estado de estresse oxidativo, diminuição dos níveis de neurotrofinas e alterações do metabolismo energético (Valvassori et al., 2015; Varela et al., 2015; Lopes-borges et al., 2015).

Os resultados da correlação de Pearson demonstraram que a atividade da HDAC e DNMT estão relacionadas positivamente com o comportamento do tipo maníaco nos modelos de d-amph e PSP. Alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre a validade de constructo desses modelos e alterações epigenéticas. A administração crônica de meta-amph pode alterar os padrões de metilação e diminuir a expressão de proteínas relacionadas a sinalização neural no hipocampo e córtex frontal de ratos. Os autores sugerem que essas alterações podem estar envolvidas nos mecanismos moleculares da ação da meta-amph (Cheng et al., 2015). Zhai et al. (2018) demonstraram *in vitro* que os processos de metilação do DNA e acetilação de histonas medeiam a expressão de transportador de dopamina humano (hDAT) em linhagens de células dopaminérgicas. A região promotora desse gene é altamente metilada e o tratamento com 5-aza-dc, um inibidor da metiltransferase, e/ou BS pode diminuir o estado de metilação e aumentar a expressão gênica de hDAT. Esses resultados sugerem que o BS pode modular a expressão de hDAT por ambos os mecanismos epigenéticos, acetilação de histonas e metilação de DNA, agindo sobre a sinalização dopaminérgica. Esses resultados poderiam explicar, pelo menos em parte, os efeitos do BS sobre comportamento e mecanismos epigenéticos no modelo animal de mania induzido por d-amph. Schroeder et al. (2013) demonstraram que a administração do composto 60, um inibidor de HDAC1 e HDAC2, mas não HDAC3, reverteu a hiperlocomoção induzida por amph. É importante ressaltar que BS age sobre HDAC1 e HDAC2, enquanto VPA age apenas em HDAC1, apontando para a potencial relação dessas isoformas específicas na alteração comportamental induzida por amph.

Diversos estudos têm sugerido que os mecanismos pelos quais a PSP induz comportamento maníaco pode estar relacionada com alterações epigenéticas, especialmente em genes relacionados com os ritmos circadianos (Sternier e Berger, 2000). É importante ressaltar que a proteína CLOCK, um dos fatores de transcrição mais importantes na regulação dos genes dos ritmos circadianos, também possui

atividade histona acetiltransferase. O heterodímero CLOCK/BMAL1 pode recrutar HDAC1, HDAC2 e sirtuínas para regular diversos outros genes circadianos como Per1 Dbp (Nakahata et al., 2008). Além de agir como HAT por si só, CLOCK também pode se associar com CBP e P300, duas proteínas HAT (Takahata et al., 2000). Além das modificações de histona, estudos também tem sugerido que alterações no metiloma estão envolvidos nos efeitos da PSP. A região promotora dos genes circadianos Per1 e Cry1 são hipermetiladas em tecido adiposo de homens após uma noite de privação do sono (Cedernaes et al., 2015). Massart et al (2014) demonstrara, que a privação do sono em camundongos induz a hipermetilação do gene Dlg4. Esses genes codificam as proteínas de densidade pós-sináptica 95 (PSD-95 - do inglês *Postsynaptic Density Protein 95*) que é responsável por regular sinapses excitatórias. A diminuição da expressão gênica dessa proteína pode levar a alterações comportamentais, como aumento do comportamento repetitivo e do tipo ansioso (Feyder et al., 2010). Juntos, esses resultados sugerem que a alteração de histonas e metilação de DNA induzidas pela PSD altera a expressão gênica de diversos genes, o quais podem desempenhar um papel nos mecanismos de alteração comportamentais induzidos por PSP.

Por outro lado, não existe uma correlação da atividade da HDAC e DNMT com o número de cruzamentos no modelo animal de mania induzido por OUA. Até o momento não existe na literatura estudos avaliando o efeito modulatório da Na⁺/K⁺-ATPase sobre as enzimas epigenéticas. É conhecido que a despolarização e troca de íons, especialmente Ca²⁺, pode alterar expressão de algumas proteínas em células neuronais; entretanto, essa alteração parece estar relacionada com a ativação de outros fatores de transcrição, como o CREB (Sheng et al., 1990; Carlezon et al., 2005)

O presente estudo demonstrou uma correlação positiva entre a atividade de HDAC e DNMT nos três modelos animais de mania. As interações entre metilação de DNA e modificação de cromatina são conhecidas há muito tempo. Dois estudos semelhantes descreveram primeiramente que o DNMT metilados poderia recrutar HDAC via MeCP2, levando a uma desacetilação de histona e condensação da cromatina. O tratamento com o inibidor de HDAC tricostatina A atenuou a repressão gênica induzida pela metilação de DNA, apontando para um efeito cruzado entre essas duas alterações epigenéticas (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Mais tarde foi descrito que esses mecanismos não afetam apenas a acetilação, mas também a

metilação de histonas (Fuks et al., 2003). Entretanto, no presente estudo foi demonstrado que a diminuição da atividade da HDAC é acompanhada pela diminuição da atividade da DNMT, sugerindo uma interação no sentido contrário do descrito anteriormente. Os efeitos da HDAC na metilação do DNA ainda não estão completamente descritos; entretanto, alguns estudos sugerem que a HDAC possui um efeito direto sobre a DNMT (Dobosy e Selker, 2001). A DNMT de eucariotos possui longos domínios N-terminais que interagem com HDAC1 e HDAC2. Essa interação DNMT/HDAC parece ser importante para a manutenção das regiões de heterocromatina no cromossomo, que é caracterizada por histonas hipoacetiladas e DNA altamente metilado (Fuks et al., 2000; Robertson et al., 2000; Rountree et al., 2000; Fuks et al., 2003).

O protocolo de PM induziu comportamento depressivo, que pode ser observado através do aumento do tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado. Esses resultados corroboram com diversos estudos prévios, que demonstram que a PM induz comportamento do tipo depressivo em animais (Réus et al., 2017; Maciel et al., 2018; Shepard et al., 2018a). O cuidado e contato parental próximo é uma característica dos mamíferos de uma forma geral; entretanto, em algumas espécies de roedores como os ratos, esse contato nos primeiros dias de vida desempenha um papel importante no desenvolvimento emocional e cognitivo da ninhada. Os primeiros dias de vida moldam as respostas comportamentais, emocionais e fisiológicas na vida adulta (Kaffman e Meaney, 2007). A perturbação da relação mãe-filhote em ratos desencadeia diversos efeitos negativos de longa duração nos filhotes. Esses efeitos são desenvolvidos devido a ativação repetida de mediadores de estresse, como glicocorticoides e catecolaminas, que têm sido descritas por McEwen (2003) como carga alostática. A carga alostática afeta o desenvolvimento neuroquímico e comportamental durante a vida, e pode ser considerada como modelos animais para transtornos psiquiátricos (Vetulani, 2013). De fato, essa teoria vai de encontro com várias observações clínicas que mostram que a negligência e maus-tratos de crianças em estágios iniciais do desenvolvimento, aumentam o risco de incidência de TDM na fase adulta (Kaufman e Charney, 2001), muitas vezes influenciando também na resistência ao tratamento psicoterápico e farmacológico (Nemeroff et al., 2003).

Bem como o modelo de PM, o protocolo de ECM também induziu um aumento no tempo de imobilidade e redução no tempo de nado dos animais no teste

de nado forçado, quando comparados com o grupo controle. Diversos estudos também demonstram que o ECM induz uma gama de comportamentos do tipo depressivo em ratos (Han et al., 2018; Réus et al., 2018; Shen et al., 2018; Zhao et al., 2018). O modelo de ECM também é fundamentado na ativação de mediadores de estresse; porém, esse modelo baseia-se na exposição repetida e imprevisível de ratos adultos a uma série de diferentes situações micro estressoras consideradas “suaves”, mas que devido a sua cronicidade acabam atribuindo a esse protocolo uma faixa de “moderadamente estressora” de modo geral (Willner, 2017). Em pacientes é possível observar que a exposição crônica a estressores psicológicos da vida moderna, tais como desemprego, pressão no trabalho, perda de entes queridos, divórcio, violência, problemas de saúde, problemas financeiros, entre outros, induzem uma vulnerabilidade aumentada dos transtornos do humor, como o TDM (Nemeroff, 2004; Yang et al., 2015). Esses eventos estressores podem induzir uma série de alterações fisiológicas, incluindo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sistema nervoso simpático (Wong e Licinio, 2001; Armbruster et al., 2011). De fato, disfunções do eixo HHA é uma das alterações mais comuns, sendo manifestado em cerca de 70% dos pacientes depressivos (Holsboer, 2000; Pariante e Lightman, 2008).

No presente estudo, o tratamento com BS apresentou um moderado efeito antidepressivo, revertendo parcialmente a imobilidade induzida pela PM e ECM. Esses resultados corroboram com outros estudos, que demonstram que o BS possui um efeito antidepressivo (Resende et al., 2013; Valvassori et al., 2014). O teste de nado forçado é um dos testes mais utilizados para investigar os efeitos antidepressivos de novas moléculas em estudos farmacológicos (Kokras et al., 2015). Já é bem conhecido que, na maioria dos casos, os agentes farmacológicos antidepressivos *per se* são capazes de diminuir o tempo de comportamento passivo e aumentar o tempo de comportamento ativo durante a sessão de teste do nado forçado (Cryan et al., 2002; 2005); todavia, mesmo no método original descrito por Porsolt (1979) quanto no método adaptado por Detke et al. (1995), inibidores seletivos de serotonina e noradrenalina *per se* podem não apresentar alteração no tempo de imobilidade em alguns casos (Kokras et al., 2015). Isso pode explicar o fato do BS não alterar o tempo de imobilidade de nado nos grupos não-privado/não-estressado.

O modelo de PM aumentou a atividade da HDAC no hipocampo e estriado, mas não no córtex frontal de ratos. Levine et al. (2012) demonstraram que os efeitos da PM sobre a acetilação de histonas podem variar durante o desenvolvimento de diferentes linhagens de camundongos. Esse estudo demonstrou que camundongos Balb/c privados da mãe apresentam aumento da expressão neocortical de HDAC1, HDAC3, HDAC7, HDAC8 e HDAC10 no 21º dia de vida; porém, a expressão das mesmas HDACs é diminuída no 60º dia de vida comparado a animais controle. Esses resultados são acompanhados por diminuição da acetilação de H4K8 e H4K12 no 21º dia e aumento da acetilação de H4K5, H4K8 e H4K12 no 60º dia de vida. Entretanto, em camundongos C57Bl/6 nenhuma alteração, tanto na expressão de HDACs quanto na acetilação de histonas H4 foi observada.

Corroborando com o presente resultado, Albuquerque-filho et al. (2017) demonstrou que a PM aumentou a atividade da HDAC no hipocampo de ratos adultos e essa alteração parece estar ligada ao desempenho dos animais no teste de reconhecimento de objetos. Os autores não encontraram alteração nos níveis de acetilação da histona H3, podendo esse efeito estar ligado a outros alvos. Suri et al. (2014) também demonstraram que a PM aumenta a atividade da HDAC2, HDAC6 e HDAC8 no hipocampo de ratos. Esses resultados sugerem que os efeitos da PM sobre parâmetros de acetilação de histonas podem variar de acordo com a espécie e até mesmo linhagem animal.

O tratamento com BS foi capaz de diminuir a atividade da HDAC nos animais controle e reverter o aumento da atividade causado pela PM no córtex frontal e no hipocampo dos ratos. Outros estudos também demonstraram que diferentes inibidores da HDAC, como CI-994, SAHA foram capazes de reverter as alterações nos padrões de acetilação da histona induzido pela PM (Moloney et al., 2015; Shepard et al., 2018b).

O modelo de PM também aumentou a atividade da DNMT no hipocampo e no estriado dos ratos no presente estudo. Ignácio e colaboradores (2017) também demonstraram que a PM em ratos induziu aumento na atividade da DNMT no hipocampo e núcleo *accumbens*, mas não no córtex frontal. Outros estudos mostraram um aumento na expressão da DNMT1 e DNMT3a no hipocampo de ratos adultos submetidos a PM durante o período pós-natal (Boku et al., 2015; Park et al., 2018). No presente estudo, a atividade da DNMT foi reduzida após o tratamento com BS. Os efeitos do tratamento com inibidores da HDAC sobre a atividade da DNMT

no modelo animal de PM ainda não foi descrito, sendo esse o primeiro trabalho a realizar tal análise.

A atividade da HAT não foi alterada em nenhum grupo experimental no modelo de depressão induzida por PM, exceto por uma diminuição causada pelo BS *per se* no córtex frontal. Baseando-se nos demais resultados do presente estudo, acredita-se que essa alteração possa ter ocorrido ao acaso. Além disso, o único estudo avaliando a atividade da HAT nesse modelo também demonstrou que esse protocolo não induz alterações na atividade dessa enzima no córtex frontal, hipocampo e estriado de ratos (Ignácio et al., 2017).

Os resultados da correlação de Pearson apontam uma correlação positiva entre o comportamento depressivo e a atividade da HDAC no hipocampo e no estriado. Um estudo prévio demonstrou que os antidepressivos imipramina e cetamina revertem o aumento da atividade da HDAC causada pela PM no núcleo *accumbens* de ratos. Da mesma forma, a inibição da HDAC através de diferentes agentes farmacológicos como CI-994, SAHA e BS revertem o comportamento depressivo induzido pela PM, evidenciando o papel dessa enzima no comportamento depressivo nesse modelo (Moloney et al., 2015; Shepard et al., 2018b). Dentre os potenciais mecanismos biológicos pelos quais a HDAC modula o comportamento depressivo no modelo de PM, pode-se citar o aumento da expressão dos mediadores de sobrevivência e plasticidade neuronal, o BDNF e a Proteína de Ancoragem à Quinase A (AKAP – do inglês A-kinase anchoring protein). Diversos estudos têm demonstrado que os inibidores da HDAC revertem a diminuição da expressão de BDNF e AKAP, através de alteração de histonas, melhorando a transmissão sináptica e comportamento no modelo de PM (Valvassori et al., 2014; Authement et al., 2015; Albuquerque-Filho et al., 2017; Shepard et al., 2018b). A atividade da DNMT também foi correlacionada positivamente com o comportamento do tipo depressivo induzido por PM. Um estudo demonstrou que a quetiapina, fármaco utilizado para o tratamento do TDM refratário, foi capaz de reverter o comportamento do tipo depressivo induzido pela PM, e essa reversão comportamental foi acompanhada pela reversão do aumento da DNMT no hipocampo (Ignácio et al., 2017). Além disso, a administração de escitalopram, um potente antidepressivo, também reverte o comportamento depressivo e aumento de expressão da DNMT1 e DNMT3a em ratos submetidos PM (Park et al., 2018). De fato, as alterações dos padrões de metilação do DNA também parecem afetar

regiões gênicas importantes para a modulação do comportamento no modelo de PM. Park et al. (2018) descreveram que a PM induz repressão da transcrição de BDNF, através de mecanismos epigenéticos que incluem a metilação da região promotora desse gene. A PM também parece diminuir a diferenciação de células neuronais precursoras adultas através do aumento da DNMT1 (Boku et al., 2015). Juntos esses resultados sugerem que a modulação da DNMT pode estar relacionada com o comportamento do tipo depressivo bem como efeitos anti-depressivos de diversos agentes farmacológicos.

O protocolo de ECM aumentou a atividade da HDAC no córtex frontal e hipocampo e o tratamento com BS foi capaz de reverter essas alterações, nenhuma alteração na atividade da HAT foi observada. Ferland e Schrader (2011) mostraram que o ECM diminuiu a acetilação da H4K12 e H3k9 no hipocampo e essa alteração foi acompanhada do aumento da atividade da sirtuina 1. Os autores também demonstraram que o tratamento com sirtino, um inibidor de sirtuina, reverteu essas alterações. Um outro estudo demonstrou que a aplicação do protocolo de ECM antes e durante a gestação em camundongos foi capaz de reduzir a acetilação de H3K14 no hipocampo da prole adulta de machos e fêmeas (Benoit et al., 2015). Erburu et al. (2015) demonstraram que o protocolo de estresse crônico por derrota social em camundongos aumentou a expressão de Hdac8, Hdac5, Hdac7, Sirt2, Sirt3 e Sirt6. Além disso, a derrota social aumentou os níveis de HDAC5 no núcleo e reduziu a acetilação das histonas H3 e H4 no córtex frontal dos camundongos. Por outro lado, estudos demonstraram que o modelo de estresse crônico por derrota social aumentou a acetilação da H3K9 no cérebro de camundongos (Covington et al., 2015), H3K9 e H3K14 em ratos Sprague–Dawley (Hinwood et al., 2011) e acetilação global da histona H3 no hipocampo de ratos (Hollis et al., 2010). O estresse crônico induzido por contenção espacial é capaz de induzir comportamentos do tipo depressivo em camundongos, Han et al. (2014) descreveram que esse protocolo diminui os níveis da HDAC2 no hipocampo; entretanto, os níveis de acetilação de H3 também diminuíram, e esse efeito perdurou por até 7 dias. Os autores também demonstraram que o tratamento com BS foi capaz de reestabelecer os níveis de acetilação de H3 no hipocampo total, giro denteado e região CA2/3. Embora alguns desses protocolos sejam distintos do utilizado no presente estudo, tanto o modelo de ECM quanto os modelos de derrota social e contenção espacial, baseiam-se na exposição crônica às situações estressoras. Isso sugere que a HDAC pode estar

envolvida nos mecanismos biológicos pelos quais o estresse crônico induz alterações comportamentais.

É importante ressaltar que o tratamento com BS não diminuiu a atividade de HDAC nos animais controle no modelo de ECM. Acredita-se que essa discrepância possa estar relacionada a idade dos animais, uma vez que os animais submetidos ao protocolo de ECM são mortos mais tardiamente comparado aos outros modelos do presente estudo, e que o envelhecimento altera padrões de acetilação de histonas já em animais de meia idade (Peleg et al., 2016), podendo talvez afetar os efeitos do BS sobre essa enzima.

A atividade da DNMT foi aumentada em todas as estruturas cerebrais avaliadas após o protocolo de ECM e o tratamento com BS foi capaz de reverter essa alteração. Os trabalhos sobre os efeitos do estresse crônico sobre DNMT são extremamente escassos na literatura. A exposição de camundongos a situação de derrota social por três dias consecutivos não alterou a expressão de DNMT1 e DNMT3a na amígdala (Wright et al., 2017). O protocolo de desamparo aprendido (composto por uma sessão teste onde os animais recebiam eletrochoques inescapáveis nas patas e uma sessão de teste constituída por 30 eletrochoques dos quais os animais poderiam escapar), foi capaz de aumentar metilação global de DNA no hipocampo e no córtex frontal, bem como a atividade hipocampal de DNMT3a em ratos (Sales et al., 2018). Benoit et al. (2015) também demonstraram que o ECM pré-natal aumentou os níveis de DNMT1 na prole fêmea adulta, mas não na prole de machos adultos. Os efeitos de inibidores da HDAC sobre a essa enzima em modelos de estresse crônico não haviam sido descritos na literatura até o momento.

Através do teste de correlação de Pearson foi possível observar uma correlação positiva entre o tempo de imobilidade no nado forçado e a atividade de HDAC. De fato, o antidepressivo imipramina é capaz de reverter a expressão aumentada de HDAC5, Sirt2 e Sirt3 e reverter a diminuição de acetilação de histonas H3 e H4 no modelo de estresse crônico (Erburu et al., 2015). A administração de fluoxetina também foi capaz de reverter a redução nos níveis de acetilação de histona H3 induzida pelo protocolo de estresse crônico por derrota social (Covington et al., 2015). Outros estudos também demonstram que os inibidores de HDAC, BS, vorinostat e MS-275, também são capazes de diminuir o comportamento depressivo induzido por estresse crônico (Golden et al., 2013; Valvassori et al., 2014; Kv et al., 2018). Juntos esses dados sugerem que a

modulação de histonas está envolvida com os comportamentos do tipo depressivo. Dentre os principais mecanismos pelos quais a modulação de histona pode induzir seu efeito antidepressivo, especula-se sobre o aumento da acetilação de histonas nas regiões promotoras de BDNF, CREB e RAC1, proteínas promotoras de plasticidade sináptica (Golden et al., 2013; Erburu et al., 2015), aumento na atividade de glutatona e redução dos níveis de interleucina (Kv et al., 2018)

A atividade da DNMT também está relacionada com o comportamento depressivo. Le François et al. (2015) demonstraram que a administração de imipramina reverteu as alterações nos padrões de metilação induzida pelo protocolo de ECM. No protocolo de desamparo aprendido a imipramina e a cetamina são capazes de reverter o aumento de metilação do DNA e atividade de DNMTs no cérebro de roedores (Ju et al., 2017; Sales et al., 2018). Esses resultados sugerem a ligação da atividade de DNMT com o comportamento do tipo depressivo induzido por ECM. Os principais alvos de metilação relacionados ao comportamento depressivo induzido pelo estresse crônico bem como nos efeitos antidepressivos são a região promotora dos genes de CRF, BDNF; receptores 5-HT_{1A} e MKP-1 (Elliott et al., 2010; Le François et al., 2015; Wang et al., 2015; Ju et al., 2017).

Foi possível observar uma correlação entre a atividade de DNMT e HDAC em ambos os modelos de depressão. Os efeitos modulatórios que essas enzimas exercem uma sobre a outra foram previamente discutidos para os modelos de mania. Acredita-se que os mesmos mecanismos se apliquem para os efeitos vistos nos modelos de mania e depressão.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que as alterações das enzimas epigenéticas não estão relacionadas com os mecanismos pelos quais os modelos induzem comportamentos do tipo maníaco, uma vez que o modelo de OUA induziu comportamentos do tipo maníaco sem alterar a atividade de HDAC, DNMT e HAT. Por outro lado, o comportamento do tipo depressivo pode estar relacionado com alterações nessas enzimas epigenéticas. Entretanto, fica evidente que o efeito antimaníaco e antidepressivo está relacionado com a modulação da HDAC e DNMT, visto que o tratamento foi capaz de reverter o comportamento maníaco e depressivo em todos os modelos.

Os resultados do presente estudo também demonstram um efeito cruzado entre as enzimas HDAC e DNMT, e que o potencial terapêutico dos inibidores da HDAC pode ser proveniente de mais de uma alteração epigenética, não apenas alteração na conformação de histonas. Esses achados podem abrir portas para novas abordagens terapêuticas para o tratamento de transtornos do humor, focando em fármacos com novos alvos terapêuticos, bem como terapia combinada com diferentes moduladores epigenéticos.

7 LIMITAÇÕES E DIREÇÕES FUTURAS

É importante ressaltar que no presente estudo foram utilizados apenas ratos e camundongos machos. Uma vez que as respostas comportamentais e bioquímicas podem variar entre os sexos, esse fato pode ser considerado como uma limitação metodológica e pode ser realizado em estudos futuros.

A lacuna no conhecimento sobre como os moduladores epigenéticos podem ser utilizados para o tratamento do TB e TDM é pertinente e o presente estudo traz luz aos possíveis mecanismos desses agentes em uma perspectiva epigenética. Futuros estudos devem focar em subtipos específicos de cada enzima epigenética, bem como seus alvos específicos, afim de refinar ainda mais os alvos farmacológicos e potencializar os efeitos terapêuticos dos moduladores epigenéticos.

REFERÊNCIAS

- Aas M, Haukvik UK, Djurovic S, Tesli M, Athanasiu L, Bjella T, Hansson L, Cattaneo A, Agartz I, Andreassen OA, Melle I. Interplay between childhood trauma and BDNF val66met variants on blood BDNF mRNA levels and on hippocampus subfields volumes in schizophrenia spectrum and bipolar disorders. *J Psychiatr Res* 2014;59: 14–21.
- Agnew-Blais J; Danese A. Childhood maltreatment and unfavourable clinical outcomes in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry* 2016;3:342–349.
- Aizawa S, Yamamuro Y. Valproate administration to mice increases hippocampal p21 expression by altering genomic DNA methylation. *Neuroreport*. 2015;26(15): 915-20.
- Albuquerque Filho MO, de Freitas BS, Garcia RC, Crivelaro PC, Schröder N, de Lima MN. Dual influences of early-life maternal deprivation on histone deacetylase activity and recognition memory in rats. *Neuroscience*. 2017;344:360-370.
- Allan J, Hartman PG, Crane-Robinson C, Aviles FX. The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*. 1980;288:675–679.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5^a ed. Washinton, DC: American Psychiatric Publishing; 2013.
- Anderson G, Maes M. Bipolar disorder: role of immune-inflammatory cytokines, oxidative and nitrosative stress and tryptophan catabolites. *Curr Psychiatry Rep*. 2015;17(2):8.
- Arent CO, Valvassori SS, Fries GR, Stertz L, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Mariot E, Varela RB, Ornell F, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Neuroanatomical profile of antimaniac effects of histone deacetylases inhibitors. *Mol Neurobiol*. 2011;43(3):207-14.
- Arent CO, Valvassori SS, Steckert AV, Resende WR, Dal-Pont GC, Lopes-Borges J, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. The effects of n-acetylcysteine and/or deferoxamine on manic-like behavior and brain oxidative damage in mice submitted to the paradoxal sleep deprivation model of mania. *J Psychiatr Res*. 2015;65:71-9.
- Armani F, Andersen ML, Andreatini R, Frussa-Filho R, Tufik S, Galduróz JC. Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(2):119-25.
- Armbruster D, Mueller A, Strobel A, Lesch KP, Brocke B, Kirschbaum C. Predicting cortisol stress responses in older individuals: influence of serotonin receptor 1A gene (HTR1A) and stressful life events. *Horm Behav*. 2011;60(1):105-111.
- Baglioni C, Battagliese G, Feige B, Spiegelhalder K, Nissen C, Voderholzer U, Lombardo C, Riemann D. Insomnia as a predictor of depression: a meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies. *J Affect Disord*. 2011;135(1-3):10-9.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21:381–395.

Barichello T, Badawy M, Pitcher MR, Saigal P, Generoso JS, Goularte JA, Simões LR, Quevedo J, Carvalho AF. Exposure to perinatal infections and bipolar disorder: a systematic review. *Curr Mol Med* 2016;16:106–118

Benoit JD, Rakic P, Frick KM. Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behav Brain Res*. 2015;281:1-8.

Beyer DKE, Freund N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. *Int J Bipolar Disord*. 2017;5(1):35.

Bielau H, Brisch R, Gos T, Dobrowolny H, Baumann B, Mawrin C, Kreutzmann P, Bernstein HG, Bogerts B, Steiner J. Volumetric analysis of the hypothalamus, amygdala and hippocampus in non-suicidal and suicidal mood disorder patients--a post-mortem study. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12(7):914-20.

Bochtler M, Kolano A, Xu GL. DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *Bioessays*. 2017;39(1):1-13.

Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I. Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol Psychiatry*. 2015;77(4):335-44.

Brady RO, Keshavan M. Emergent treatments based on the pathophysiology of bipolar disorder: A selective review. *Asian J Psychiatr*. 2015;18:15-21.

Brown NC, Andreazza AC, Young LT. An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry research*. 2014; 218(1-2):61-8.

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

Camelo S, Iglesias AH, Hwang D, Due B, Ryu H, Smith K, Gray SG, Imitola J, Duran G, Assaf B, Langley B, Khoury SJ, Stephanopoulos G, De Girolami U, Ratan RR, Ferrante RJ, Dangond F. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2005;164:10-21.

Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci*. 2005;28(8):436-45.

Cheng MC, Hsu SH, Chen CH. Chronic methamphetamine treatment reduces the expression of synaptic plasticity genes and changes their DNA methylation status in the mouse brain. *Brain Res*. 2015;1629:126-34.

Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev*. 2013;65(1):105-42.

Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, Collier DA. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2005;10:771– 781.

- Choudhuri S. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21(4):252-74.
- Clemente AS, Diniz BS, Nicolato R, Kapczinski FP, Soares JC, Firmo JO, Castro-Costa É. Bipolar disorder prevalence: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Braz J Psychiatr*. 2015;37(2):155-61.
- Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS, Brown CJ. Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(6):1528-39.
- Covington HE 3rd, Maze I, Vialou V, Nestler EJ. Antidepressant action of HDAC inhibition in the prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2015;298:329-35.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:238-245.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29:547-569.
- da-Rosa DD, Valvassori SS, Steckert AV, Arent CO, Ferreira CL, Lopes-Borges J, Varela RB, Mariot E, Dal-Pizzol F, Andersen ML, Quevedo J. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012;119(1):31-8.
- David DJ, Gourion D. Antidepressant and tolerance: Determinants and management of major side effects. *Encephale*. 2016;42(6):553-561.
- de Bartolomeis A, Buonaguro EF, Iasevoli F, Tomasetti C. The emerging role of dopamine-glutamate interaction and of the postsynaptic density in bipolar disorder pathophysiology: Implications for treatment. *J Psychopharmacol*. 2014;28(6):505-526.
- De Pradier M, Gorwood P, Beaufile B, Adès J, Dubertret C. Influence of the serotonin transporter gene polymorphism, cannabis and childhood sexual abuse on phenotype of bipolar disorder: a preliminary study. *Eur Psychiatry* 2010; 25: 323–327.
- Dell'Osso B, D'Addario C, Carlotta Palazzo M, Benatti B, Camuri G, Galimberti D, Fenoglio C, Scarpini E, Di Francesco A, Maccarrone M, Altamura AC. Epigenetic modulation of BDNF gene: differences in DNA methylation between unipolar and bipolar patients. *J Affect Disord*. 2014;166:330–333.
- Della FP, Abelaira HM, Réus GZ, Santos MA, Tomaz DB, Antunes AR, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J. Treatment with tianeptine induces antidepressant-like effects and alters the neurotrophin levels, mitochondrial respiratory chain and cycle Krebs enzymes in the brain of maternally deprived adult rats. *Metab Brain Dis*. 2013;28(1):93-105.
- Dias de Mattos Souza L, Lopez Molina M, Azevedo da Silva R, Jansen K. History of childhood trauma as risk factors to suicide risk in major depression. *Psychiatry Res*. 2016;246:612-616.
- Dobosy JR, Selker EU. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(5-6):721-7.

- Doboszewska U, Wlaż P, Nowak G, Radziwoń-Zaleska M, Cui R, Młyniec K. Zinc in the Monoaminergic Theory of Depression: Its Relationship to Neural Plasticity. *Neural Plast.* 2017;2017:3682752.
- Duan R, Liu X, Wang T, Wu L, Gao X, Zhang Z. Histone Acetylation Regulation in Sleep Deprivation-Induced Spatial Memory Impairment. *Neurochem Res.* 2016;41(9):2223-32.
- Eban-Rothschild A, Rothschild G, Giardino WJ, Jones JR, de Lecea L. VTA dopaminergic neurons regulate ethologically relevant sleep-wake behaviors. *Nat Neurosci.* 2016;19(10):1356-66.
- Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(1):41-50.
- Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 1990;1(6):469-490.
- Elliott E, Ezra-Nevo G, Regev L, Neufeld-Cohen A, Chen A. Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nat Neurosci.* 2010;13:1351-1354.
- El-Mallakh RS, Wyatt RJ. The Na,K-ATPase hypothesis for bipolar illness. *Biol Psychiatry.* 1995;37(4):235-44.
- Elvir L, Duclot F, Wang Z, Kabbaj M. Epigenetic regulation of motivated behaviors by histone deacetylase inhibitors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;pii:S0149-7634(17)30069-6.
- Erburu M, Muñoz-Cobo I, Domínguez-Andrés J, Beltran E, Suzuki T, Mai A, Valente S, Puerta E, Tordera RM. Chronic stress and antidepressant induced changes in Hdac5 and Sirt2 affect synaptic plasticity. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(11):2036-48.
- Ernst C, Chen ES, Turecki G. Histone methylation and decreased expression of TrkB.T1 in orbital frontal cortex of suicide completers. *Mol Psychiatry.* 2009a;14:830–832.
- Ernst C, Deleva V, Deng X, Sequeira A, Pomarenski A, Klempan T, Ernst N, Quirion R, Gratton A, Szyf M, Turecki G. Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Arch Gen Psychiatry.* 2009b;66:22–32.
- Fajutrao L, Locklear J, Priaulx J, Heyes A. A systematic review of the evidence of the burden of bipolar disorder in Europe. *Clin Pract Epidemiol Ment Health.* 2009;5:3.
- Fan J; Sklar P. Genetics of bipolar disorder: focus on BDNF Val66Met polymorphism. *Novartis Found Symp* 2008; 289: 60–72.
- Fass DM, Schroeder FA, Perlis RH, Haggarty SJ. Epigenetic mechanisms in mood disorders: targeting neuroplasticity. *Neuroscience.* 2014;264:112-30.
- Feng Y, Xie Z, Jiang X, Li Z, Shen Y, Wang B, Liu J. The Applications of Promoter-gene-Engineered Biosensors. *Sensors (Basel).* 2018; 18(9):pii:E2823.
- Ferland CL, Schrader LA. Regulation of histone acetylation in the hippocampus of chronically stressed rats: a potential role of sirtuins. *Neuroscience.* 2011;174:104–114.

- Ferrari AJ, Somerville AJ, Baxter AJ, Norman R, Patten SB, Vos T, Whiteford HA. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. *Psychol Med*. 2013; 43(3):471-81.
- Feyder M, Karlsson RM, Mathur P, Lyman M, Bock R, Momenan R, Munasinghe J, Scattoni ML, Ihne J, Camp M, Graybeal C, Strathdee D, Begg A, Alvarez VA, Kirsch P, Rietschel M, Cichon S, Walter H, Meyer-Lindenberg A, Grant SG, Holmes A. Association of mouse *Dlg4* (PSD-95) gene deletion and human *DLG4* gene variation with phenotypes relevant to autism spectrum disorders and Williams' syndrome. *Am. J. Psychiatry*. 2010;167(12):1508-17.
- Frey BN, Andrezza AC, Ceresér KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*. 2006;79(3):281-6.
- Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T. DNA methylation profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene as a potent diagnostic biomarker in major depression. *PLoS One*. 2011;6:e23881.
- Fucic A, Stojkovi R, Miskovic S, Zeljezic D, Markovic D, Gjergjac R, Katica J, Jazbec AM, Bakulic TI, Demarinc V. Transplacental genotoxicity of antiepileptic drugs: Animal model and pilot study on mother/newborn cohort. *Reproductive Toxicology*. 2010;30:613-18.
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase *Dnmt1* associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000;24(1):88-91.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*. 2003;278(6):4035-40.
- Galecka E, Talarowska M, Maes M, Su KP, Górski P, Kumor-Kisielewska A, Szemraj J. Expression levels of interferon- γ and type 2 deiodinase in patients diagnosed with recurrent depressive disorders. *Pharmacol Rep*. 2018;70(1):133-138.
- Gaine ME, Chatterjee S, Abel T. Sleep Deprivation and the Epigenome. *Front Neural Circuits*. 2018;12:14.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int*. 2003;42(2):107-14.
- Ganguly S, Seth S. A translational perspective on histone acetylation modulators in psychiatric disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018.[Epub ahead of print].
- Gavin DP, Kartan S, Chase K, Jayaraman S, Sharma RP. Histone deacetylase inhibitors and candidate gene expression: an in vivo and in vitro approach to studying chromatin remodeling in a clinical population. *J Psychiatr Res*. 2009;43:870-6
- Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*. 2013;381(9878):1672-1682.

- Gibbs M, Winsper C, Marwaha S, Gilbert E, Broome M, Singh SP. Cannabis use and mania symptoms: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 2015; 171: 39–47.
- Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain: the disposition of (3H) norepinephrine, (3H) dopamine and (3H) dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*. 1965;13:655-69.
- Golden SA, Christoffel DJ, Heshmati M, Hodes GE, Magida J, Davis K, Cahill ME, Dias C, Ribeiro E, Ables JL, Kennedy PJ, Robison AJ, Gonzalez-Maeso J, Neve RL, Turecki G, Ghose S, Tamminga CA, Russo SJ. Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. *Nat Med*. 2013;19(3):337-44.
- Goldstein I, Lerer E, Laiba E, Mallet J, Mujaheed M, Laurent C, Rosen H, Ebstein RP, Lichtstein D. Association between sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase alpha isoforms and bipolar disorders. *Biol Psychiatry*. 2009;65(11):985-91.
- Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet*. 2016;387:1561-72.
- Greenberg PE, Fournier AA, Sisitsky T, Pike CT, Kessler RC. The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010). *J Clin Psychiatry*. 2015;76(2):155-62.
- Guarraci FA, Bolton JL. "Sexy stimulants": the interaction between psychomotor stimulants and sexual behavior in the female brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;121:53-61.
- Hahn CG, Wang HY, Koneru R, Levinson DF, Friedman E. Lithium and valproic acid treatments reduce PKC activation and receptor-G protein coupling in platelets of bipolar manic patients. *J Psychiatr Res*. 2005;39(4):355-63.
- Han A, Sung YB, Chung SY, Kwon MS. Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: targeting the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2014;81:292-302.
- Han YX, Tao C, Gao XR, Wang LL, Jiang FH, Wang C, Fang K, Chen XX, Chen Z, Ge JF. BDNF-Related Imbalance of Copine 6 and Synaptic Plasticity Markers Couples With Depression-Like Behavior and Immune Activation in CUMS Rats. *Front Neurosci*. 2018;12:731.
- Herman L, Hougland T, El-Mallakh RS. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(6):874-81.
- Hinwood M, Tynan RJ, Day TA, Walker FR. Repeated social defeat selectively increases delta FosB expression and histone H3 acetylation in the infralimbic medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2011;21:262–271.
- Hobara T, Uchida S, Otsuki K, Matsubara T, Funato H, Matsuo K, Suetsugi M, Watanabe Y. Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. *J Psychiatr Res*. 2010;44:263-70.
- Hoertel N, de Maricourt P, Gorwood P. Novel routes to bipolar disorder drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2013;8(8):907-18.

- Hoffmann A, Sportelli V, Ziller M, Spengler D. Epigenomics of Major Depressive Disorders and Schizophrenia: Early Life Decides. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):pii:E1711.
- Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975;187(4173):226-32
- Hollis F, Wang H, Dietz D, Gunjan A, Kabbaj M. The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague–Dawley rats. *Psychopharmacology.* 2010;211:69–77.
- Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(5):477-501.
- Iga J, Ueno S, Yamauchi K, Numata S, Kinouchi S, Tayoshi-Shibuya S, Song H, Ohmori T. Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31:628–632.
- Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, de Moura AB, Matos D, Demo JP, da Silva JB, Gava FF, Valvassori SS, Carvalho AF, Quevedo J. Quetiapine treatment reverses depressive-like behavior and reduces DNA methyltransferase activity induced by maternal deprivation. *Behav Brain Res.* 2017;320:225-232.
- Irvine RA, Lin IG, Hsieh CL. DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(19):6689-96.
- Jarbo K, Verstynen TD. Converging structural and functional connectivity of orbitofrontal, dorsolateral prefrontal, and posterior parietal cortex in the human striatum. *J Neurosci.* 2015;35(9):3865-78.
- Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(7):310-8.
- Jiang R, Brummett BH, Babyak MA, Siegler IC, Williams RB. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met and adulthood chronic stress interact to affect depressive symptoms. *J Psychiatr Res.* 2013;47(2):233-9.
- Jiang X, Dai X, Kale Edmiston E, Zhou Q, Xu K, Zhou Y, Wu F, Kong L, Wei S, Zhou Y, Chang M, Geng H, Wang D, Wang Y, Cui W, Wang F, Tang Y. Alteration of cortico-limbic-striatal neural system in major depressive disorder and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2017; 221:297-303.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187-91.
- Jorge RE. Mood disorders. *Handb Clin Neurol.* 2015;128:613-31.
- Jornada LK, Moretti M, Valvassori SS, Ferreira CL, Padilha PT, Arent CO, Fries GR, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of mood stabilizers on hippocampus and amygdala BDNF levels in an animal model of mania induced by ouabain. *J Psychiatr Res.* 2010;44(8):506-10.
- Jornada LK, Valvassori SS, Steckert AV, Moretti M, Mina F, Ferreira CL, Arent CO, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *J Psychiatr Res.* 2011;45(2):162-8.

- Joyce PR, Fergusson DM, Woollard G, Abbott RM, Horwood LJ, Upton J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder. *J Affect Disord*. 1995;33(4):233-43.
- Jun C, Choi Y, Lim SM, Bae S, Hong YS, Kim JE, Lyoo IK. Disturbance of the glutamatergic system in mood disorders. *Exp Neurobiol*. 2014;23(1):28-35.
- Kaffman A, Meaney M: Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48:224–244.
- Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J*. 2013;32:340–53.
- Kang HJ, Kim JM, Lee JY, Kim SY, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Kim HR, Shin MG, Yoon JS. BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients. *J Affect Disord*. 2013;151:679–685.
- Kapczinski F, Quevedo J. Transtorno bipolar: teoria e clínica. 2ªed. Porto Alegre: Artmed; 2015.
- Kato M. Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder in DSM-5: How to Manage in Clinical and Research Fields. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*. 2015;117(10):837-43.
- Katz RJ. Animal models and human depressive disorders. *Neuroscience e Behavior Reviews*. 1981;5:231-246.
- Kaufman J, Charney D. Effects of early stress on brain structure and function: implications for understanding the relationship between child maltreatment and depression. *Dev Psychopathol*. 2001;13:451–471.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Tomaiuolo R, Carli V, Angrisano T, Videtic A, Amato F, Pero R, di Giannantonio M, Iosue M, Lembo F, Castaldo G, Chiariotti L. TrkB gene expression and DNA methylation state in Wernicke area does not associate with suicidal behavior. *J Affect Disord*. 2011; 135:400–404.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Cocozza S, Fusco A, Bruni CB, Castaldo G, Chiariotti L. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67:258–267.
- Kessler RC, Bromet EJ. The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*. 2013;34:119-38.
- Khan S, Ahmad T, Chintan VP, Pushkarbhai PT, Kushwaha S, Jena G. Investigation on sodium valproate induced liver cell damage, oxidative stress and genotoxicity in male Swiss mice. *Reprod Toxicol*. 2011;32(4):385-94.
- Kim B, Im HI. The role of the dorsal striatum in choice impulsivity. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; [Epub ahead of print].
- Kim JM, Kang HJ, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Kim HR, Shin MG, Yoon JS. Association of BDNF promoter methylation and genotype with suicidal ideation in elderly Koreans. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2014;22:989–996.

- Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene x Environment Interactions. *Neuron*. 2015;86(6):1343-57.
- Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C. Forced swim test: What about females? *Neuropharmacology*. 2015;99:408-21.
- Konstantakopoulos G, Dimitrakopoulos S, Michalopoulou PG. Drugs under early investigation for the treatment of bipolar disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015;24(4):477-90.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693–705.
- Kurup AR, Kurup PA. Membrane Na(+)-K+ ATPase mediated cascade in bipolar mood disorder, major depressive disorder, and schizophrenia--relationship to hemispheric dominance. *Int J Neurosci*. 2002;112(8):965-82.
- Kv A, Madhana RM, Js IC, Lahkar M, Sinha S, Naidu VGM. Antidepressant activity of vorinostat is associated with amelioration of oxidative stress and inflammation in a corticosterone-induced chronic stress model in mice. *Behav Brain Res*. 2018;344:73-84.
- Le François B, Soo J, Millar AM, Daigle M, Le Guisquet AM, Leman S, Minier F, Belzung C, Albert PR. Chronic mild stress and antidepressant treatment alter 5-HT1A receptor expression by modifying DNA methylation of a conserved Sp4 site. *Neurobiol Dis*. 2015;82:332-341.
- Le JM, Squarize CH, Castilho RM. Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):511-25.
- Levine A, Worrell TR, Zimnisky R, Schmauss C. Early life stress triggers sustained changes in histone deacetylase expression and histone H4 modifications that alter responsiveness to adolescent antidepressant treatment. *Neurobiol Dis*. 2012;45(1):488-98.
- Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science*. 1967;156:258–260.
- Lex C, Bazner E and Meyer TD. Does stress play a significant role in bipolar disorder? A meta-analysis. *J Affect Disord* 2017;208:298–308
- Li R, el-Mallakh RS, Harrison L, Changaris DG, Levy RS. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. Toward an animal model for manic depression. *Mol Chem Neuropathol*. 1997;31(1):65-72.
- Lichtstein D, Ilani A, Rosen H, Horesh N, Singh SV, Buzaglo N, Hodes A. Na⁺, K⁺-ATPase Signaling and Bipolar Disorder. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).pii:E2314.
- Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, Jia Y. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0138904.
- Liu PK, Liu CH. Epigenetics of amphetamine-induced sensitization: HDAC5 expression and microRNA in neural remodeling. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):90.
- Looney SW, El-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na, K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety*. 1997;5:53–65.

- Lopes-Borges J, Valvassori SS, Varela RB, Tonin PT, Vieira JS, Gonçalves CL, Streck EL, Quevedo J. Histone deacetylase inhibitors reverse manic-like behaviors and protect the rat brain from energetic metabolic alterations induced by ouabain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;128:89-95.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Luan Y, Ngo L, Han Z, Wang X, Qu M, Zheng YG. Histone Acetyltransferases: Enzymes, Assays, and Inhibitors. In: Zheng YG. *Epigenetic Technological Applications.* London: Academic Press; 2015. p.291-317.
- Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(3):143-54.
- Ludwig B, Dwivedi Y. Dissecting bipolar disorder complexity through epigenomic approach. *Mol Psychiatry.* 2016;21(11):1490-1498.
- Lund C, Tomlinson M, De Silva M, Fedaku A, Shidhaye R, Jordans M, Petersen I, Bhana A, Kigozi F, Prince M, Thornicroft G, Hanlon C, Kakuma R, McDaid D, Saxena S, Chisholm D, Raja S; Kippen-Wood S, Honkman S, Fairall L, Patel V. PRIME: A programme to reduce the treatment gap for mental disorders in five low- and middle-income countries. *PLOS Medicine.* 2012;9:1-6.
- MacDonald K, Krishnan A, Cervenka E, Hu G, Guadagno E, Trakadis Y. Biomarkers for major depressive and bipolar disorders using metabolomics: A systematic review. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2018; [Epub ahead of print].
- Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate Jr CA. Histone Deacetylases and Mood Disorders: Epigenetic Programming in Gene-Environment Interactions. *CNS Neurosci Ther.* 2011;17(6):699-704.
- Maciel AL, Abelaira HM, de Moura AB, de Souza TG, Rosa T, Matos D, Tuon T, Garbossa L, Strassi AP, Fileti ME, Goldim MP, Mathias K, Petronilho F, Quevedo J, Réus GZ. Acute treatment with ketamine and chronic treatment with minocycline exert antidepressant-like effects and antioxidant properties in rats subjected different stressful events. *Brain Res Bull.* 2018;137:204-216.
- Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M, Mela V, Llorente-Berzal Á, Prada C, Viveros MP. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;51:151-63.
- Martin TA, Jayanthi S, McCoy MT, Brannock C, Ladenheim B, Garrett T, Lehrmann E, Becker KG, Cadet JL.. Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/hypoacetylation in the rat nucleus accumbens. *PLoS One.* 2012;7(3):e34236.
- Marwaha S, Winsper C, Bebbington P, Smith D. Cannabis Use and Hypomania in Young People: A Prospective Analysis. *Schizophr Bull.* 2018;44(6):1267-1274.
- Massart R, Freyburger M, Suderman M, Paquet J, El Helou J, Belanger-Nelson E, Rachalski A, Koumar OC, Carrier J, Szyf M, Mongrain V. The genome-wide landscape of DNA methylation and hydroxymethylation in response to sleep deprivation impacts on synaptic plasticity genes. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e347.

- Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, Zhao K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.* 2013;23(11):1256-69.
- McCarren M, Alger BE. Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: role of a Ca²⁺-dependent conductance. *J Neurophysiol.* 1987;57(2):496-509.
- McEwen BS. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2003;9:149–154.
- Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92(3):364-9.
- Millan MJ, Rivet JM, Gobert A. The frontal cortex as a network hub controlling mood and cognition: Probing its neurochemical substrates for improved therapy of psychiatric and neurological disorders. *J Psychopharmacol.* 2016; 30(11):1099-1128.
- Minassian A, Young JW, Cope ZA, Henry BL, Geyer MA, Perry W. Amphetamine increases activity but not exploration in humans and mice. *Psychopharmacology. (Berl).* 2016;233(2):225-33.
- Mitrousis N, Tropepe V, Hermanson O. Post-Translational Modifications of Histones in Vertebrate Neurogenesis. *Front Neurosci.* 2015;9:483.
- Moloney RD, Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(12):1831-6.
- Montejo AL, Montejo L, Navarro-Cremades F. Sexual side-effects of antidepressant and antipsychotic drugs. *Curr Opin Psychiatry.* 2015 Nov;28(6):418-23.
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.
- Moretti M, Valvassori SS, Varela RB, Ferreira CL, Rochi N, Benedet J, Scaini G, Kapczinski F, Streck EL, Zugno AI, Quevedo J. Behavioral and neurochemical effects of sodium butyrate in an animal model of mania. *Behav Pharmacol.* 2011;22(8):766-72.
- Mrazek DA, Hornberger JC, Altar CA, Degtiar I. A review of the clinical, economic, and societal burden of treatment-resistant depression: 1996–2013. *Psychiatr Serv Am Psychiatr Assoc Arlington.* 2014;65(8):977–87.
- Murray CJ, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science.* 1996;274:740–3.
- Mynett-Johnson L, Murphy V, McCormack J, Shields DC, Claffey E, Manley P, McKeon P. Evidence for an allelic association between bipolar disorder and a Na⁺, K⁺ adenosine triphosphatase alpha subunit gene (ATP1A3). *Biol Psychiatry.* 1998;44(1):47-51.
- Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell.* 2008;134(2):329-40.

- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393(6683):386-9.
- Narwade SC, Mallick BN, Deobagkar DD. Transcriptome Analysis Reveals Altered Expression of Memory and Neurotransmission Associated Genes in the REM Sleep Deprived Rat Brain. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:67.
- Nemeroff CB, Heim CM, Thase ME, Klein DN, Rush AJ, Schatzberg AF, Ninan PT. Differential responses to psychotherapy versus pharmacotherapy in patients with chronic forms of major depression and childhood trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:14293–14296.
- Nemeroff CC. Early-life adversity, CRF dysregulation, and vulnerability to mood and anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull*. 2004;38:14–20
- Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1161-9.
- Nestler EJ, Peña CJ, Kundakovic M, Mitchell A, Akbarian S. Epigenetic Basis of Mental Illness. *Neuroscientist*. 2016; 22(5):447-63.
- Nieuwenhuys R. The greater limbic system, the emotional motor system and the brain. *Prog Brain Res*. 1996;107:551-80.
- Numachi Y, Shen H, Yoshida S, Fujiyama K, Toda S, Matsuoka H, Sora I, Sato M, Methamphetamine alters expression of DNA methyltransferase 1 mRNA in rat brain. *Neurosci Lett*. 2007;414(3):213-7.
- Numachi Y, Yoshida S, Yamashita M, Fujiyama K, Naka M, Matsuoka H, Sato M, Sora I. Psychostimulant alters expression of DNA methyltransferase mRNA in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1025:102-9.
- Palmier-Claus JE, Berry K, Bucci S, Mansell W, Varese F. Relationship between childhood adversity and bipolar affective disorder: systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2016; 209: 454–459.
- Palmos AB, Breen G, Goodwin L, Frissa S, Hatch SL, Hotopf M, Thuret S, Lewis CM, Powell TR. Genetic Risk for Psychiatric Disorders and Telomere Length. *Front Genet*. 2018;9:468.
- Pantazopoulos H, Stone D, Walsh J, Benes FM. Differences in the cellular distribution of D1 receptor mRNA in the hippocampus of bipolars and schizophrenics. *Synapse*. 2004;54(3):147-55.
- Papp M, Gruca P, Lason-Tyburkiewicz M, Willner P. Antidepressant, anxiolytic and procognitive effects of subacute and chronic ketamine in the chronic mild stress model of depression. *Behav Pharmacol*. 2017;28(1):1-8.
- Pariante CM; Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*. 2008;31(9):464-468.
- Park SW, Seo MK, Lee JG, Hien LT, Kim YH. Effects of maternal separation and antidepressant drug on epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor exon I promoter in the adult rat hippocampus. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018;72(4):255-265.

- Patestas MA, Gartner LP. "Limbic system". In: A textbook of neuroanatomy. 1sted. Oxford: Blackwell Publishing; 2006. 344-359.
- Peedicayil J. Epigenetic approaches for bipolar disorder drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2014;9(8):917-30.
- Peleg S, Feller C, Ladurner AG, Imhof A. The Metabolic Impact on Histone Acetylation and Transcription in Ageing. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(8):700-711.
- Perugi G, Vannucchi G, Bedani F, Favaretto E. Use of stimulant in bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2017;19(1):7.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266(5604):730-2.
- Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine,* 1979;30:139:140.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057-68.
- Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H. GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biol Psychiatry.* 2008;64:645–652.
- Purves WK, Orians GH, Heller HC. *Life, the Science of Biology: The Cell and Heredity.* 5thed. New York: W.H. Freeman; 1997.
- Quevedo J, da Silva AG. *Depressão: Teoria e Clínica.* 1sted. São Paulo: Artmed; 2013.
- Ramírez LA, Pérez-Padilla EA, García-Oscos F, Salgado H, Atzori M, Pineda JC. A new theory of depression based on the serotonin/kynurenine relationship and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Biomedica.* 2018;38(3):437-450.
- Resende WR, Valvassori SS, Réus GZ, Varela RB, Arent CO, Ribeiro KF, Bavaresco DV, Andersen ML, Zugno AI, Quevedo J. Effects of sodium butyrate in animal models of mania and depression: implications as a new mood stabilizer. *Behav Pharmacol.* 2013;24(7):569-79.
- Réus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Carlessi AS, Tomaz DB, Neotti MV, Liranço JL, Gubert C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res.* 2013;256:451-6.
- Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, de Souza TG, Abelaira HM, Carneiro C, Wendhausen D, Michels M, Pescador B, Dal-Pizzol F, Macêdo DS, Quevedo J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res.* 2017;95:196-207.
- Réus GZ, Maciel AL, Abelaira HM, de Moura AB, de Souza TG, Dos Santos TR, Darabas AC, Parzianello M, Matos D, Abatti M, Vieira AC, Fucillini V, Michels M, Dal-Pizzol F, Quevedo J. ω -3 and folic acid act against depressive-like behavior and oxidative damage in the brain of rats subjected to early- or late-life stress. *Nutrition.* 2018;53:120-133.

- Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975;14(1):9-25.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet.* 2000;25:338–342.
- Rose AM, Mellett BJ, Valdes RJr, Kleinman JE, Herman MM, Li R, el-Mallakh RS. Alpha 2 isoform of the Na,K-adenosine triphosphatase is reduced in temporal cortex of bipolar individuals. *Biol Psychiatry.* 1998;44(9):892-7.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.* 2000;25:269–277.
- Rowland TA, Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2018;8(9):251-269.
- Sales AJ, Joca SRL. Antidepressant administration modulates stress-induced DNA methylation and DNA methyltransferase expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 2018;343:8-15.
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2018; [Epub ahead of print].
- Sanchez-Villegas A, Toledo E, De Irala J, Ruiz-Canela M, Pla-Vidal J, MartinezGonzalez MA. Fast-food and commercial baked goods consumption and the risk of depression. *Public Health Nutrition.* 2012;15:424–432.
- Scheuer S, Wiggert N, Brückl TM, Awaloff Y, Uhr M, Lucae S, Kloiber S, Holsboer F, Ising M, Wilhelm FH. Childhood abuse and depression in adulthood: The mediating role of allostatic load. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;94:134-142.
- Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry.* 2007;62:55-64.
- Schroeder FA, Lewis MC, Fass DM, Wagner FF, Zhang YL, Hennig KM, Gale J, Zhao WN, Reis S, Barker DD, Berry-Scott E, Kim SW, Clore EL, Hooker JM, Holson EB, Haggarty SJ, Petryshen TL. A selective HDAC 1/2 inhibitor modulates chromatin and gene expression in brain and alters mouse behavior in two mood-related tests. *PLoS One.* 2013;8(8):e71323.
- Schuermann D, Weber AR, Schär P. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair (Amst).* 2016;44:92-102.
- Scott J, McNeill Y, Cavanagh J, Cannon M, Murray R. Exposure to obstetric complications and subsequent development of bipolar disorder: Systematic review. *Br J Psychiatry* 2006;189:3–11.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(4):a018713.
- Shen J, Qu C, Xu L, Sun H, Zhang J. Resveratrol exerts a protective effect in chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior: involvement of the

AKT/GSK3 β signaling pathway in hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018. [Epub ahead of print]

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron*. 1990;4(4):571-82.

Shepard RD, Gouty S, Kassis H, Berenji A, Zhu W, Cox BM, Nugent FS. Targeting histone deacetylation for recovery of maternal deprivation-induced changes in BDNF and AKAP150 expression in the VTA. *Exp Neurol*. 2018b;309:160-168.

Shepard RD, Langlois LD, Browne CA, Berenji A, Lucki I, Nugent FS. Ketamine Reverses Lateral Habenula Neuronal Dysfunction and Behavioral Immobility in the Forced Swim Test Following Maternal Deprivation in Late Adolescent Rats. *Front Synaptic Neurosci*. 2018a;10:39.

Shibasaki M, Mizuno K, Kurokawa K, Ohkuma S. L-type voltage-dependent calcium channels facilitate acetylation of histone H3 through PKC γ phosphorylation in mice with methamphetamine-induced place preference. *J Neurochem*. 2011;118(6):1056-66.

Steckert AV, Valvassori SS, Varela RB, Mina F, Resende WR, Bavaresco DV, Ornell F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effects of sodium butyrate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of D-AMPH. *Neurochem Int*. 2013;62(4):425-32.

Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol Biol Rev*. 2000;64(2):435-59.

Stertz L, Fries GR, Aguiar BW, Pfaffenseller B, Valvassori SS, Gubert C, Ferreira CL, Moreti M, Ceresér KM, Kauer-Sant'Anna M. Histone deacetylase activity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in a pharmacological model of mania. *Rev Bras Psiquiatr*. 2014; 36(1):39-46.

Streck EL, Scaini G, Jeremias GC, Rezin GT, Gonçalves CL, Ferreira GK, Réus GZ, Resende WR, Valvassori SS, Kapczinski F, Andersen ML, Quevedo J. Effects of Mood Stabilizers on Brain Energy Metabolism in Mice Submitted to an Animal Model of Mania Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. *Neurochem Res*. 2015;40(6):1144-52.

Subramaniam M, Abdin E, Vaingankar JA, Nan L, Heng D, McCrone P, Chong SA. Impact of psychiatric disorders and chronic physical conditions on health-related quality of life: Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord*. 2013;147(1-3):325-30.

Sung YH. Study on emotion by rest time in mice with repetitive sleep deprivation. *J Exerc Rehabil*. 2017;13(2):143-147.

Suri D, Bhattacharya A, Vaidya VA. Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17(2):289-301.

Szabo ST, Machado-Vieira R, Yuan P, Wang Y, Wei Y, Falke C, Cirelli C, Tononi G, Manji HK, Du J. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. *Neuropharmacology*. 2019;56(1):47-55.

Szczepanski SM, Knight RT. Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. *Neuron*. 2014; 83(5):1002-18.

Takahata S, Ozaki T, Mimura J, Kikuchi Y, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes Cells*. 2000;5:739–747.

Tang B, Dean B, Thomas EA. Disease-and age-related changes in histone acetylation at gene promoters in psychiatric disorders. *Transl Psychiatry* 2011; 1:e64.

Tang J, Chen X, Cai B, Chen G. A logical relationship for schizophrenia, bipolar, and major depressive disorder. Part 4: Evidence from chromosome 4 high-density association screen. *J Comp Neurol*. 2018 [Epub ahead of print].

Taylor MK, Beckerley SE, Henniger NE, Hernández LM, Larson GE, Granger DA. A genetic risk factor for major depression and suicidal ideation is mitigated by physical activity. *Psychiatry Res*. 2017;249:304-306.

Teychenne M, Ball K, Salmon J. Sedentary behavior and depression among adults: a review. *Int J Behav Med*. 2010;17(4):246-54.

Uddin M, Koenen KC, Aiello AE, Wildman DE, de los Santos R, Galea S. Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample. *Psychol Med*. 2011;41:997–1007.

Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther*. 2018;pii:S0163-7258(18)30198-0.

Ustün TB, Ayuso-Mateos JL, Chatterji S, Mathers C, Murray CJ. Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry*. 2004;184:386-92.

Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood Disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;2:S121-31.

Valvassori SS, Varela RB, Arent CO, Dal-Pont GC, Bobsin TS, Budni J, Reus GZ, Quevedo J. Sodium butyrate functions as an antidepressant and improves cognition with enhanced neurotrophic expression in models of maternal deprivation and chronic mild stress. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(4):359-66.

Valvassori SS, Arent CO, Steckert AV, Varela RB, Jornada LK, Tonin PT, Budni J, Mariot E, Kapczinski F, Quevedo J. Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania. *Mol Neurobiol*. 2015;52(1):353-62.

Valvassori SS, Varela RB, Quevedo J. Animal models of mood disorders: focus on bipolar disorder and depression. In: Conn PM, animal models for the study of human disease. Academic Press, London, 2017a, 991-1002.

Valvassori SS, Resende WR, Dal-Pont G, Sangaletti-Pereira H, Gava FF, Peterle BR, Carvalho AF, Varela RB, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lithium ameliorates sleep deprivation-induced mania-like behavior, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis alterations, oxidative stress and elevations of cytokine concentrations in the brain and serum of mice. *Bipolar Disord*. 2017b;19(4):246-258.

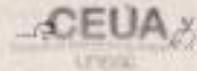
Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Jornada LK, Peterle BR, Machado AG, Farias HR, de Souza CT, Carvalho AF, Quevedo J. Lithium and valproate act on the

- GSK-3 β signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology*. 2017c;117:447-459.
- Valvassori SS, Resende WR, Varela RB, Arent CO, Gava FF, Peterle BR, Dal-Pont GC, Carvalho AF, Andersen ML, Quevedo J4. The Effects of Histone Deacetylase Inhibition on the Levels of Cerebral Cytokines in an Animal Model of Mania Induced by Dextroamphetamine. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(2):1430-1439.
- Varela RB, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Mariot E, Dal-Pont GC, Amboni RT, Bianchini G, Quevedo J. Sodium butyrate and mood stabilizers block ouabain-induced hyperlocomotion and increase BDNF, NGF and GDNF levels in brain of Wistar rats. *J Psychiatr Res*. 2015;61:114-21.
- Vasan S, Olango GJ. Amphetamine Toxicity. StatPearls [Internet]. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470276/>.
- Veselinovic T, Paulzen M, Gründer G. Cariprazine, a new, orally active dopamine D2/3 receptor partial agonist for the treatment of schizophrenia, bipolar mania and depression. *Expert Rev Neurother*. 2013;13(11):1141-59.
- Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1451-61.
- Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology*. 2004;50(4):305-10.
- Wager TD, Woo CW. Imaging biomarkers and biotypes for depression. *Nat Med*. 2017;23(1):16-17.
- Walker ER, McGee RE, Druss BG. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(4):334-41.
- Wang CH, Zhang XL, Li Y, Wang GD, Wang XK, Dong J, Ning QF. Role of hippocampus mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mRNA expression and DNA methylation in the depression of the rats with chronic unpredicted stress. *Cell Mol Neurobiol*. 2015; 35(4):473-82.
- Wang J, Fanous S, Terwilliger EF, Bass CE, Hammer RP Jr, Nikulina EM. BDNF overexpression in the ventral tegmental area prolongs social defeat stress-induced cross-sensitization to amphetamine and increases Δ FosB expression in mesocorticolimbic regions of rats. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(11):2286-96.
- Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics*. 2016;8:59.
- Willner P, Gruca P, Lason M, Tota-Glowczyk K, Litwa E, Niemczyk M, Papp M. Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. *Behav Pharmacol*. 2018. [Epub ahead of print]
- Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2016;6:78-93.
- Wong ML; Licinio J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(5):343-351

- Wright EC, Johnson SA, Hao R, Kowalczyk AS, Greenberg GD, Ordoñez Sanchez E, Laman-Maharg A, Trainor BC, Rosenfeld CS. Exposure to extrinsic stressors, social defeat or bisphenol A, eliminates sex differences in DNA methyltransferase expression in the amygdala. *J Neuroendocrinol*. 2017;29(6);10.1111/jne.12475.
- Wu CS, Yu SH, Lee CY, Tseng HY, Chiu YF, Hsiung CA. Prevalence of and risk factors for minor and major depression among community-dwelling older adults in Taiwan. *Int Psychogeriatr*. 2017; 29(7):1113-1121.
- Xu Q, Xie W. Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends Cell Biol*. 2018;28(3):237-253.
- Yang L, Zhao Y, Wang Y, Liu L, Zhang X, Li B, Cui R. The Effects of Psychological Stress on Depression. *Curr Neuropharmacol*. 2015;13(4):494-504.
- Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)- α by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER- α -negative breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:7025–7029.
- Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20:259–266.
- Zhai D, Li S, Dong G, Zhou D, Yang Y, Wang X, Zhao Y, Yang Y, Lin Z. The correlation between DNA methylation and transcriptional expression of human dopamine transporter in cell lines. *Neurosci Lett*. 2018;662:91-97.
- Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep*. 2015;16(11):1467-81.
- Zhao C, Wang F, Pun FW, Mei L, Ren L, Yu Z, Ng SK, Chen J, Tsang SY, Xue H. Epigenetic regulation on GABRB2 isoforms expression: developmental variations and disruptions in psychiatric disorders. *Schizophr Res*. 2012;134:260-6.
- Zhao L, Lin Y, Lao G, Wang Y, Guan L, Wei J, Yang Z, Ni P, Li X, Jiang Z, Li T, Hao X, Lin D, Cao L, Ma X. Association study of dopamine receptor genes polymorphism with cognitive functions in bipolar I disorder patients. *J Affect Disord*. 2015;170:85-90.
- Zhao Y, Wang Q, Jia M, Fu S, Pan J, Chu C, Liu X, Liu X, Liu Z. (+)-Sesamin attenuates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and memory deficits via suppression of neuroinflammation. *J Nutr Biochem*. 2018;64:61-71.
- Zhou Z, Wang Y, Tan H, Bharti V, Che Y, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizer lithium inhibits amphetamine-induced risk-taking manic-like behaviors. *Neurosci Lett*. 2015;603:84-8.
- Zhu H, Huang Q, Xu H, Niu L, Zhou JN. Antidepressant-like effects of sodium butyrate in combination with estrogen in rat forced swimming test: involvement of 5-HT(1A) receptors. *Behav Brain Res*. 2009;196(2):200-206.
- Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2003;3(3):187-99.
- Zhou Q, Agoston AT, Atadja P, Nelson WG, Davidson NE. Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA

methyltransferase 1 in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6(5):873-83.

ANEXO A - Paracer de aprovação do projeto 1 pela CEUA da UNESCO.



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 102/2012

Professor Responsável: João Quevedo

Equipe: Roger Varela, Daniela Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane Carvalho, Leticia Calegari, Gustavo Dal Pont, Camila Arent e Wilson Resende.

Título: 'AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVOS E ANTIMANIÁCOS DO BUTIRATO DE SÓDIO EM MODELOS ANIMAIS DE MANIA E DEPRESSÃO: IMPLICAÇÕES PARA A VALIDAÇÃO DE UM NOVO ESTABILIZADOR DE HUMOR'

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada a CEUA. Foi autorizada a utilização 424 ratos wistar e 80 camundongos black C57BL/6. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 102/2012

Principal Investigator: João Quevedo

Researchers: Roger Varela, Daniela Bavaresco, Samira Valvassori, Juliane Carvalho, Leticia Calegari, Gustavo Dal Pont, Camila Arent e Wilson Resende.

Project title: 'ANTIDEPRESSANTS AND EVALUATION OF THE EFFECTS OF ANTIMANIC SODIUM BUTYRATE IN ANIMAL MODELS OF DEPRESSION AND MANIA: IMPLICATIONS FOR THE VALIDATION OF A NEW MOOD STABILIZER'.

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

Criciúma, 09 de outubro de 2012.

Patricia Fernanda Schuck
Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA

ANEXO B - Paracer de aprovação do projeto 2 pela CEUA da UNESCO.



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação Dos Efeitos Do Butirato De Sódio Sobre Os Níveis De Citocinas Em Modelos Animais De Mania Induzidos Por Anfetamina E Privação Do Sono Paradoxal”, Protocolo nº 007/2016-1 sob a responsabilidade de Samira da Silva Valvassori, equipe: Roger B. Varela, Wilson R. Resende, Daniela V. Bavaresco, Gustavo C. Dal-Pont, Edemilson Mariot, Camila Leite Ferreira, Jéssica Lopes-Borges, Bruna Peterle, Gabriela Barbosa Nadas, Guilherme Bianchini, Fernanda Frederico Gava, Mikaela Miranda, Paula Tonin, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	01/03/2016 a 01/03/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Black C57Bl/6 Rato heterogênico Wistar
Nº. De animais	160
Peso/Idade	20-30g / 60 dias 250-300g / 60 dias
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

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

Protocol number: 007/2016-1

Principal Investigator: Samira da Silva Valvassori

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

Project title: “Assessment Of The Effects Of Sodium Butyrate On Levels Of Cytokines In Animal Models Of Mania Induced By Amphetamine And Sleep Deprivation Paradoxical”.

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

Criciúma, 23 de fevereiro de 2016.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
 Coordenador da CEUA