

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

DAYANE DIOMÁRIO DA ROSA

**ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS POR OUABAINA EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO
BIPOLAR**

CRICIÚMA

2021

DAYANE DIOMÁRIO DA ROSA

**INDUÇÃO DE ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS POR
OUABAINA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE
TRANSTORNO BIPOLAR**

Tese submetida à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Quevedo
Coorientadora: Profa. Dra. Samira Valvassori

CRICIÚMA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R788i Rosa, Dayane Diomário da.
Indução de alterações por ouabaina em ratos
submetidos ao modelo animal de transtorno bipolar /
Dayane Diomário da Rosa. - 2021.
60 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: João Quevedo.

Coorientação: Samira Valvassori.

1. Lítio - Efeitos colaterais. 2. Transtorno
bipolar. 3. Ouabaina. 4. Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata Dayane Diomário da Rosa, sob o título “ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS POR OUABAINA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO BIPOLAR” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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


Criciúma, SC, 29 de setembro de 2021.

Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo – UNESC

Profa. Dra. MARISA JADNA SILVA FREDERICO
Membro Externo – UFC

Handwritten signature of Samira S. Valvassori in blue ink.

Profa. DRA. SAMIRA S. VALVASSORI
Coorientadora -UNESC

Handwritten signature of Emilio Luiz Streck in blue ink.

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul

Catarinense – UNESC.

“Especialmente aos meus pais, os quais sempre foram meus alicerces para minha caminhada até aqui. Ao meu amado filho Eduardo, que me ensinou a querer sempre ser uma pessoa melhor”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Odilon Diomário da Rosa e Vanda Fernandes da Rosa, que me guiaram nos princípios éticos e morais e que estiveram sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Agradeço ao meu filho, Eduardo Diomário Siqueira, por me incentivar a ser um ser humano melhor e que deu à minha vida um sentido ainda mais especial.

Ao meu companheiro de vida, Iuri da Rocha Siqueira, por sempre torcer, apoiar e vibrar por minhas conquistas.

Agradeço ao Dr. João Quevedo, meu orientador, por me inspirar à formação acadêmica. Muita admiração pela competência.

Agradeço à Coorientadora deste trabalho, Dra. Samira Valvassori, por tanta dedicação e ser para mim um estímulo pela busca à ciência.

Agradeço aos pacientes, que confiam suas vidas a mim e que me estimulam à busca de conhecimento.

Agradeço aos meus professores da pós-graduação da UNESC e a todos que contribuíram para adquirir conhecimento.

“A ciência será sempre uma busca e jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada”.

KARL POPPER

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) é uma condição vitalícia caracterizada pela presença de episódios maníacos / hipomaníacos, depressivos e de humor misto. O lítio (Li) é o único medicamento classificado como estabilizador do humor e o padrão-ouro para a terapia do TB. A etiologia do TB tem sido associada a uma diminuição da atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, o que é corroborado por estudos com animais e pacientes com TB. Além disso, são observadas alterações nos níveis de citocinas em modelos animais e em pacientes bipolares. A ouabaína (OUA) é um inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, e sua administração intracerebroventricular (ICV) em ratos é considerada um modelo animal TB induzindo comportamentos maníacos e depressivos no mesmo animal. Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos do Li sobre comportamentos maníacos e depressivos e parâmetros inflamatórios em ratos submetidos ao modelo de TB induzido por OUA. Ratos machos adultos receberam uma única injeção ICV de OUA ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa). No quarto dia após a injeção do ICV, os ratos receberam injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9%) ou Li (47,5 mg / kg), duas vezes ao dia, durante 14 dias. No sétimo dia após a injeção de OUA, foi avaliada a atividade locomotora (teste de campo aberto) e, no décimo quarto dia, a locomoção foi avaliada novamente, seguida do teste de nado forçado para avaliação do comportamento depressivo. Após a eutanásia, níveis de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF)- α e Neutrófilo quimioatraente induzido por citocina (CINC)-1 foram avaliados no córtex frontal e hipocampo. Após sete dias da administração de OUA, os animais apresentaram um comportamento hiperativo que foi revertido pelo tratamento com Li. Após 14 dias da injeção ICV, os ratos exibiram um comportamento depressivo. Em relação aos parâmetros inflamatórios, medidos após 14 dias do ICV, a OUA induziu aumento nos níveis de interleucina IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CINC-1. Em contraste, o tratamento com Li diminuiu esses parâmetros. O modelo animal de TB induzido por OUA é capaz de induzir neuroinflamação, o que sustenta sua validade de construto para a pesquisa de TB. Portanto, o presente estudo se torna uma boa ferramenta para compreender melhor as alterações neuroinflamatórias presentes durante as alterações de humor, observadas nos diferentes episódios do TB. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender esses mecanismos.

Palavras-chave: modelo animal de mania; transtorno bipolar; inflamação; ouabaína.

ABSTRACT

Bipolar disorder is a chronic and recurrent mood disorder, characterized by episodes of mania, depression, and mixed episodes. Lithium (Li) is the only drug considered mood stabilizer by FDA, being the gold standard for treatment of BD. The etiology of BD has been associated with a decrease in the Na⁺K⁺ATPase activity, corroborated by studies with animal models and BD patients. Furthermore, it is described alterations in cytokine levels in animal models and BD patients. Ouabain (OUA) is an inhibitor of Na⁺K⁺ATPase, and your intracerebroventricular (ICV) administration in rats is considered a good choice for studies of BD, inducing manic- and depressive-like behavior in the same animal. Therefore, the present study aimed investigate the effects of Li on the behavioral changes and inflammatory parameters in rats submitted to animal model of BD induced by OUA. Male Wistar rats received only ICV injection of OUA or artificial cerebral spinal fluid (aCSF). After four days of ICV, the animals received intraperitoneal injection of saline solution (NaCl 0,9%) or Li (47,5 mg / kg), twice a day, for 14 days. Seven days after ICV, was evaluated the locomotor activity (open-field test), and, in the fourteenth day after ICV, were evaluated the locomotor activity (open-field test) followed by forced-swimming test to evaluate the depressive-like behavior. Animals were killed by decapitation, and the brain was dissected in frontal cortex and hippocampus to evaluation of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and CINC-1. The animals showed manic-like behavior seven days after ICV, which was reversed by treatment with Li. After fourteen days of ICV, the rats showed depressive-like behavior. About inflammatory parameters, OUA induced increases in IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and CINC-1 levels, which were reversed by treatment of Li. Therefore, the animal model of BD induced by OUA can be a good choice for study of neuroinflammation, what sustains the construct validity of BD research.

Keywords: animal model of mania; bipolar disorder; inflammation; ouabain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-ISO – 8-isoprostano

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês, *adrenocorticotropic hormone*)

ATP – Adenosina trifosfato

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

CAT – Catalase

CINC-1 – Neutrófilo quimioatraente induzido por citocina (do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant*)

CREB – Elemento de resposta ao AMPc (do inglês, *cAMP response element-binding*)

CRF – Fator de liberação da corticotrofina (do inglês, *corticotropin releasing factor*)

DSM-5 – Quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

ERK – Proteína quinase regulada por sinais extracelulares (do inglês, *extracellular signal-regulated kinases*)

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GABA – Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *Gamma-AminoButyric Acid*)

GPx – Glutaciona peroxidase

GR – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

GSK-3 – Glicogênio sintase kinase-3

GST – Glutaciona S-transferase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

ICV – Intracerebroventricular

IL – Interleucina

IMI – Imipramina

IFN- γ – Interferon gama

Li – Lítio

LPH – Hidroperóxido de lipídeo (do inglês, *lipid hydroperoxide*)

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*)

MDA – Malondialdeído

Na⁺K⁺ATPase – Sódio-potássio de adenosina trifosfatase

NT-3 – Neurotrofina-3

NT-4 – Neurotrofina-4

$O_2^{\cdot-}$ – Ânion superóxido

$OH\cdot$ – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C reativa

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PLCy – Fosfolipase Cy

SOD – Superóxido dismutase

sIL – Receptor solúvel da interleucina

SNC – Sistema nervoso central

TB – Transtorno bipolar

TGF – Fator de crescimento transformador

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Trk – Tirosina kinase

VPA – Valproato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 TRANSTORNO BIPOLAR	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO TB	17
1.3 TRATAMENTO DO TB	18
1.4 FISIOPATOLOGIA DO TB	19
1.4.1 Fatores Psicossociais	19
1.4.2 Neurobiologia	19
1.4.3 Genética	19
1.4.4 Expressão gênica	20
1.4.5 Epigenética	20
1.4.6 Neuroinflamação	20
1.5 MODELOS ANIMAIS DE TB	23
1.5.1 Validade de face	24
1.5.2 Validade de constructo	25
1.5.3 Validade preditiva	26
1.6. MODELO ANIMAL DE TB INDUZIDO POR OUABAÍNA	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	30
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	30
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	30
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
3.4.1 Testes comportamentais	31
3.4.1.1 Campo aberto.....	31
3.4.1.2 Natação forçada	32
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	32
3.5.1 Amostras biológicas	32
3.5.2 Parâmetros de neuroinflamação	32
3.5.2.1 Quantificação de proteína	32
3.5.2.2 Níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CINC-1	33

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS	34
4.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	34
4.2 PARÂMETROS DE NEUROINFLAMAÇÃO.....	36
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Segundo a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (2013), “um transtorno mental é uma síndrome caracterizada por perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento de um indivíduo que reflete uma disfunção nos processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental”. Os transtornos mentais (TM) resultam em sofrimento ou incapacidade significativos que afetam atividades sociais, profissionais ou outras atividades importantes (American Psychiatric Association, 2013). Além disso, os TM geram alto custo social e econômico, levando à incapacitação grave e definitiva, e elevam a demanda nos serviços de saúde (Jin e McCrone, 2015).

O relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), publicado em 2001, assinalou que os TM correspondem a 12% da carga mundial de doenças e a 1% da mortalidade. O Transtorno Bipolar (TB) é considerado o terceiro TM com maior impacto na vida do paciente (Subramaniam et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o TB foi a 46ª maior causa de incapacidade e mortalidade no mundo entre 291 doenças e causas de danos, no qual colocou o TB à frente do câncer de mama bem como da Doença de Alzheimer e outras demências (Merikangas et al., 2011).

1.1 TRANSTORNO BIPOLAR

O TB é uma das formas mais prevalentes de doença mental, compreendendo diferentes mudanças de humor que podem variar entre episódios de mania ou hipomania, depressão, eutímia e estados mistos (Figura 1) (Grande et al., 2016; Resende et al., 2020). O diagnóstico é realizado através da avaliação pela anamnese do paciente e relatos dos familiares desses, e é investigado a presença de critérios segundo o DSM-5. No episódio de mania, o indivíduo precisa apresentar pelo menos cinco dos seguintes critérios (incluindo obrigatoriamente humor persistentemente elevado, expansivo ou irritável e aumento do nível de energia): aumento da autoestima, redução da necessidade de sono, pressão por fala, aumento do fluxo ou velocidade de pensamentos, distraibilidade, aumento da atividade dirigida a objetos e envolvimento em atividades com potencial para consequências dolorosas. Já para diagnosticar o episódio depressivo, deve-se apresentar pelo menos 5 dos seguintes sintomas: humor melancólico e/ou perda de interesse ou prazer, diminuição de energia, alteração de sono,

mudança de apetite, alteração psicomotora, fadiga, sentimentos de inutilidade e culpa, pensamentos recorrentes de morte. No episódio classificado “com características mistas”, há a ocorrência concomitante de sintomas de mania e depressão (American Psychiatric Association, 2013). A diferenciação entre mania e hipomania se dá pela gravidade e tempo de sintomas: a primeira é mais grave, com duração mínima de 4 dias, e o quadro é suficientemente grave para necessitar internação integral ou pela presença de sintomas psicóticos, enquanto a segunda tem duração mínima de 7 dias e é menos grave, mas ainda incapacitante (American Psychiatric Association, 2013; Beyer, 2017).



Figura 1: Episódios de humor no Transtorno Bipolar. O curso da doença de um paciente pode ser registrado em gráfico de humor. Desse modo, um exemplo de como o humor pode variar é da hipomania para mania no topo da figura, para a eutimia (ou humor normal) no meio, e para a depressão na extremidade inferior da figura (Adaptado de Stahl, 2013).

Apesar de todo o impacto que pode ocasionar, fazer o diagnóstico de TB é frequentemente difícil, e o atraso médio entre o início dos sintomas e seu estabelecimento varia entre 5 e 10 anos (Phillips e Kupfer, 2013; Kessing et al., 2017). É importante salientar que o marco para o diagnóstico é a existência de pelo menos um episódio maníaco ou hipomaniaco na história atual ou prévia, porém, mais da metade dos pacientes iniciam o transtorno com o episódio depressivo, sendo o estado mais frequente ao longo da vida do paciente bipolar (Hirschfeld, 2014). Não há exames complementares específicos, e a hipótese de TB deve ser levantada em qualquer indivíduo com sintomas de alterações de humor. É indispensável a realização de uma profunda história médica geral e psiquiátrica, detalhado exame do estado geral e físico e testes laboratoriais para avaliar possíveis diagnósticos diferenciais, como outras condições clínicas e/ou uso de substâncias simulando o transtorno (Freudenreich et al., 2011).

Além dessas avaliações, a entrevista com familiares é bastante útil para sua identificação (Goodwin e Jamison, 2007). Além da avaliação criteriosa do episódio atual, é importante verificar o número, a frequência, a intensidade e a duração dos episódios anteriores, pois o TB tem sido conceituado como um transtorno progressivo, com risco crescente de recorrência para cada novo episódio afetivo e com deficiências cognitivas e neurobiológicas progressivas (Post et al., 2012).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO TB

O TB é uma condição comum e incapacitante associada ao aumento da mortalidade em comparação com a população em geral, cuja taxa de prevalência mundial é de 1–2,5% (Merikangas et al., 2011; Hayes et al., 2017). Os portadores do transtorno apresentam comprometimento substancial, permanecendo sintomáticos com sintomas sindrômicos ou subsindrômicos por aproximadamente metade de suas vidas (Judd et al., 2002; Judd et al., 2003) e não conseguem manter suas capacidades laborais por aproximadamente 30% do tempo (Judd et al., 2008). A expectativa de vida é reduzida nesses pacientes, tanto por maior comorbidade com doenças clínicas - metabólicas, auto-imunes, cardiovasculares (Laursen et al., 2013) - quanto pelo maior risco de suicídio, que chega a ser 20 vezes maior que a da população geral, com mortalidade de 13% por essa causa (Schaffer et al., 2015; Jones et al., 2018), e está entre as três principais causas de morte desses pacientes (Ferrari et al., 2014).

O início dos sintomas pode acontecer em qualquer idade, e quanto mais precoce, pior o prognóstico (Holtzman et al., 2015). O TB frequentemente se manifesta no final da adolescência e no início da idade adulta, com uma idade média geral de início aos 18 anos para o TB tipo I e 25 anos para o tipo II (American Psychiatric Association, 2013). No entanto, o TB pediátrico muitas vezes não é reconhecido, e muitos jovens com o transtorno não recebem tratamento; estudos retrospectivos relataram que em até 60% dos adultos com o diagnóstico, o início dos sintomas de humor ocorreu antes dos 20 anos (Post et al., 2008; Birmaher, 2007).

Não são descritas diferenças estatísticas na prevalência entre os sexos, mas é descrito que mulheres têm maior suscetibilidade a ciclagens rápidas, episódios mistos e sintomas depressivos quando comparados aos portadores do sexo masculino (Rowland e Marwaha, 2018). Não se observa diferença significativa na prevalência entre as raças (Tsuchiya et al., 2003). As taxas de TB são significativamente maiores entre indivíduos separados, divorciados ou viúvos quando comparados aos casados ou nunca casados. A história de divórcio, independente do estado civil atual, é frequente. Essa associação possivelmente ocorre

por relações causais recíprocas: tanto o episódio afetivo pode ser resultado da separação quanto tensões impostas pelo TB podem levar ao rompimento (Moreno e Andrade, 2004).

1.3 TRATAMENTO DO TB

Devido à característica potencialmente crônica, recorrente e progressiva do TB, o tratamento deve ser iniciado de forma mais precoce possível (Berk et al., 2011). Há prejuízo significativo da qualidade de vida, tanto em pacientes sintomáticos quanto em não sintomáticos, quando comparados a controles saudáveis (Gutierrez-Rojas et al., 2008; Bonnin et al., 2012). Além disso, aspectos físicos, sono, humor, cognição, e lazer foram identificados pelos pacientes como sendo prejudicados (Michalak et al., 2010). Quanto maior o número de episódios e mais precoce o início da doença, maior o impacto, tanto no funcionamento psicossocial quanto na qualidade de vida (Rosa et al., 2012; Michalak et al., 2013).

A abordagem multidisciplinar de longo prazo é bem indicada para o manejo do TB; intervenções especializadas baseadas em abordagem de equipe, combinando farmacoterapia e psicoeducação são indicadas (Kessing et al., 2013; Yatham et al., 2018). O tratamento medicamentoso tem como objetivo a remissão dos episódios agudos, manutenção de remissão e recuperação funcional do paciente (Vietna et al., 2011). Entretanto, o tratamento de ambas as fases do transtorno pode ser complexo. O uso de antidepressivos por exemplo, mesmo na fase depressiva do transtorno, deve ser evitado pois podem agravar o quadro ou desencadear mania ou hipomania (Geddes e Miklowitz, 2013). Os medicamentos utilizados como primeira linha para tratamento do transtorno são os estabilizadores de humor, que podem ser de várias classes: anticonvulsivantes [valproato de sódio (VPA), lamotrigina], antipsicóticos atípicos (aripiprazol, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, ziprasidona, asenapina, lurasidona) e o lítio (Li), o qual é o único fármaco aprovado especificamente para o tratamento do TB. A escolha da medicação, isolada ou combinada, baseia-se principalmente no perfil do paciente e nos sintomas do episódio agudo ou manutenção (Yatham et al., 2018).

Embora existam várias opções terapêuticas, muitos pacientes são refratários aos medicamentos propostos ou não os toleram (Solomon et al., 2010; Yatham et al., 2013), e mesmo naqueles que mantêm o tratamento adequado a taxa de recaída é em média 40% em um ano e cerca de 73% dos casos em cinco anos (Neto e Carvalho, 2016). Para o desenvolvimento de novos fármacos e assim ampliar o arsenal terapêutico para essa condição, é necessário avançar na compreensão da fisiopatologia do TB (Kim et al., 2017).

1.4 FISIOPATOLOGIA DO TB

Mecanismos patológicos precisos do TB não são totalmente compreendidos, mas vários sistemas atuam perpetuando a condição, envolvendo fatores biológicos, psicológicos e psicossociais (Muneer, 2016a).

1.4.1 Fatores Psicossociais

Eventos de vida estressantes podem estar associados ao início mais precoce e um pior prognóstico da doença (Spalletta, 2015). 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, além de 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 abuso de substâncias (Gibbs et al., 2015; Marwaha et al., 2017).

Estudos têm evidenciado a associação entre eventos adversos sofridos e maior gravidade dos sintomas e consequente a uma pior evolução do transtorno (Sugaya et al., 2012; Etain et al., 2013; Gilman et al., 2015).

1.4.2 Neurobiologia

Várias evidências demonstram que há alterações na estrutura e função cerebral no TB. Entretanto, ainda não está claro se essas observações consistem em causas, consequências ou ambos (Adler, 2012). Estudos de imagem evidenciam redução de conexões entre redes que modulam emoções, principalmente em redes pré-frontais e sistema límbico (Townsend, 2012). Além disso, estudos longitudinais de neuroimagem em portadores de TB evidenciam redução no volume total de substância cinzenta ao longo do tempo, reforçando seu potencial neurodegenerativo (Gildengers et al., 2014).

1.4.3 Genética

Estudos envolvendo familiares, gêmeos e adoção demonstram que fatores genéticos estão envolvidos na patogênese do TB. Em gêmeos monozigóticos, o risco de desenvolver TB ao longo da vida é de 40 a 70%. Já para parentes de primeiro grau de um portador do transtorno,

a chance de desenvolver o TB é de 5 a 10% (Craddock e Sklar, 2013).

Há vários estudos tentando identificar o principal gene envolvido na origem do TB, mas nenhum gene isolado foi identificado. Os achados sugerem que há a interação de diversos genes com pequenos efeitos (Nurnberger et al., 2014).

1.4.4 Expressão gênica

A avaliação e sequenciamento de RNA de tecidos *post-mortem* e pacientes com TB e controles saudáveis, indica que a expressão gênica está alterada no TB. Estudos demonstram alterações na regulação de genes que codificam neurotransmissores e receptores de hormônios que são alvos de drogas psicotrópicas (Kato, 2015), e de genes envolvidos com neuroplasticidade (Akula et al., 2014).

1.4.5 Epigenética

A epigenética compreende alterações moleculares que modificam a expressão de proteínas 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 (Klengel e Binder, 2015). Por esse motivo, essas alterações têm sido amplamente estudadas nos transtornos psiquiátricos. Dentre as principais alterações epigenéticas pode-se citar as metilação do DNA, micro-RNAs e alterações na conformidade das histonas.

Em uma revisão de literatura Peedicayil (2014) compilou alguns estudos demonstrando que alterações na conformação das histonas parecem estar ligadas ao TB. Um estudo *post-mortem* em cérebro de pacientes bipolares, demonstrou uma maior acetilação de histonas nas regiões promotoras de genes relacionados com a esquizofrenia (TANG et al., 2011). Do mesmo modo, outro estudo mostrou uma desregulação na expressão do gene GABRB2, subunidade B2 do receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) (ZHAO et al., 2012).

1.4.6 Neuroinflamação

A inflamação é um processo reativo de defesa do organismo frente a uma agressão, podendo ser desencadeada por agentes físicos, químicos e biológicos (Doty et al., 2015). As

funções principais da inflamação contra hospedeiro são a defesa e o reparo (Rang et al., 2012), as quais agem de forma aguda e crônica e são mediadas pelo sistema imunológico.

As respostas inflamatórias agudas são transitórias, podendo durar horas ou dias. As respostas iniciais de lesões celulares e teciduais que terão como desfecho a resolução, ou cicatrização da área afetada, ou ainda a cronicidade. Na inflamação crônica, o processo de defesa se mantém ativo por semanas, meses ou anos na tentativa de reparação do tecido lesionado. Essa cascata mantida a longo prazo poderá destruir além do agente causador da inflamação, parte dos tecidos afetados. Assim, o processo inflamatório prolongado ou desregulado levará a danos diversos ao organismo (Kumar et al., 2013). Essas cascatas podem acontecer de forma sistêmica ou localizada em qualquer tecido, como no sistema nervoso central (SNC).

Existe uma interação altamente organizada e bidirecional entre o SNC e o sistema imunológico e que preserva a homeostase na saúde e na doença (Veiga-Fernandes e Artis, 2018). O SNC se comunica com o sistema imunológico por meio de vias hormonais e neurais (simpática, parassimpática e entérica). O sistema imunológico influencia o SNC por meio de citocinas de células imunológicas ativadas na periferia e microglia e astrócitos ativados na medula espinhal e no cérebro (Zouikr et al., 2017; Chavan et al., 2017).

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares produzidos e liberados em resposta ao estímulo antigênico, com potencial para interferir no metabolismo de sistemas de neurotransmissores, atividades neuroendócrinas e neuronais, na regulação do crescimento e proliferação de células gliais (Silverman et al., 2005; Sommer e White, 2010). Podem influenciar na síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores como serotonina, norepinefrina, dopamina e glutamato. Influenciam também sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) através do feedback negativo e/ou a perturbação na função dos receptores de glicocorticóides; citocinas podem influenciar na plasticidade neuronal e diminuir a expressão fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo (Felger et al., 2007; Miller et al., 2009; Brietzke et al., 2011) e desencadear apoptose em neurônios e células da glia (Kraft et al., 2009). São classificadas como pró- ou anti-inflamatórias, de acordo com as funções que desempenham. As principais citocinas anti-inflamatórias são a interleucina (IL)-10 e fator de crescimento transformador (TGF)- β , sendo que alguns antagonistas competitivos, como o antagonista do receptor de IL-1, também são considerados anti-inflamatórios. As principais citocinas pró-inflamatórias são IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α (de Oliveira et al., 2011).

O SNC pode desencadear um processo inflamatório em resposta a patógenos exógenos, a moléculas endógenas, sob condições de estresse, trauma ou degeneração (Barrientos et al., 2015). Sendo assim, a inflamação vem ganhando destaque nas pesquisas em neurologia e psiquiatria, com destaque para o TB.

Um dos primeiros estudos a relacionar alterações imunológicas com o TB trazia a hipótese de que as recidivas de episódios de humor seriam impulsionadas pelo sistema imune assim como em outras doenças inflamatórias como esclerose múltipla ou herpes recorrente (Horrobin e Lieb, 1981). Existem evidências de aumento consistente de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes bipolares (Modabbernia et al., 2013; Munkholm et al., 2013a; 2013b) e que podem variar de acordo com a fase em que se encontra. Por exemplo, apesar da proteína C reativa (PCR) estar elevada no TB, independentemente do período que o paciente acometido esteja, sua elevação é ainda mais significativa durante episódios de mania (Anderson e Maes, 2015; Malhi et al., 2018). Citocinas específicas, como a IL-6 e o TNF- α , têm sido identificados em soro de pacientes em episódio depressivo (Jope et al., 2016; Rosenblat e McIntyre, 2017). Já aumento do receptor solúvel da interleucina (sIL) 6 (sIL-6R) e sIL-2R, níveis elevados da IL-6 e do antagonista do receptor da interleucina 1 (IL-1RA) são observados nos episódios de mania (Anderson e Maes, 2015; Rosenblat e McIntyre, 2016) e, nos períodos de eutimia, o TNF- α é um marcador inflamatório constante (Rosenblat e McIntyre, 2016). Devido às evidências que demonstram altos níveis de marcadores inflamatórios na periferia e no cérebro de pacientes (Hamdani et al., 2012), alguns autores têm-se referido ao TB como uma doença multissistêmica (Leboyer et al., 2012; Stertz et al., 2013). Há um crescente número de estudos mostrando que o TB está associado a uma inflamação crônica de baixo grau (Barbosa et al., 2009; Magalhães et al., 2012) e é um alvo de investigação como um mecanismo implicado na neuroprogressão do TB.

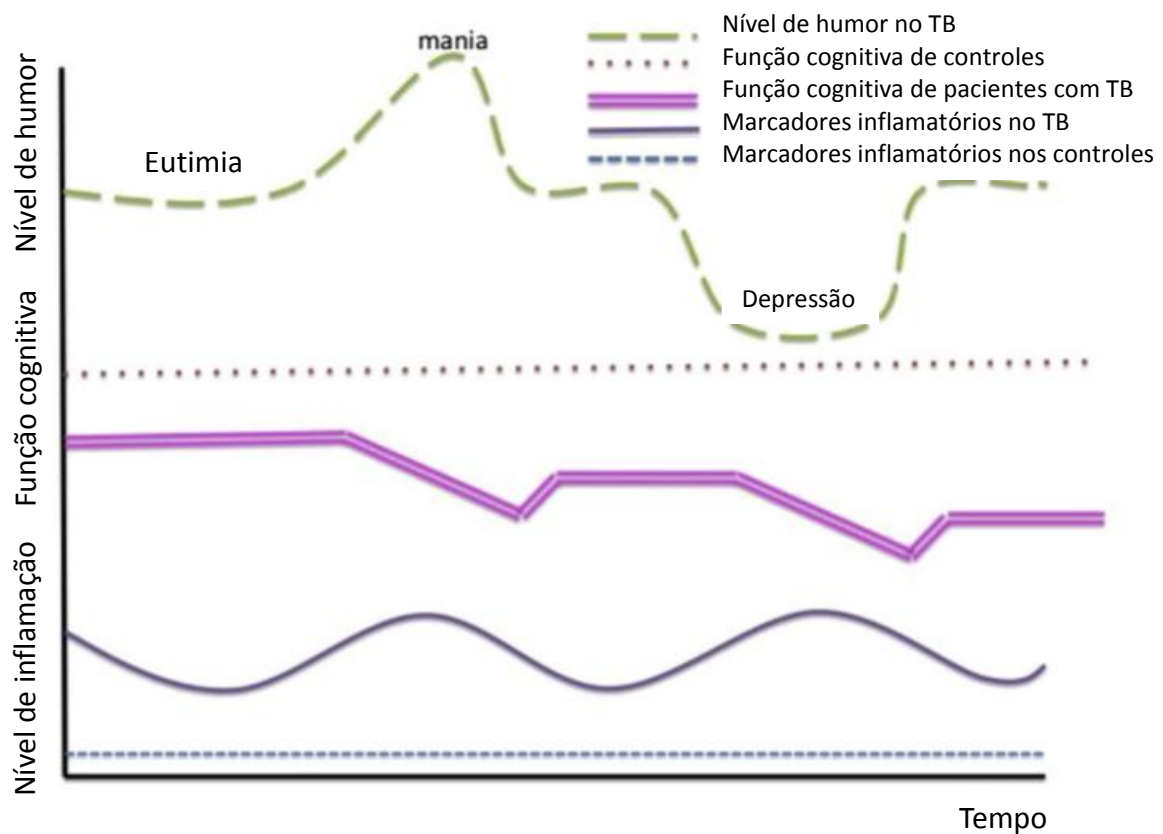


Figura 2: Hipótese da alteração inflamatória no TB. Há elevação crônica dos marcadores inflamatórios e podem aumentar nos episódios depressivo e maníaco (Adaptado de Rosenblat et al., 2016).

É desafiadora e de fundamental importância a busca pela compreensão da fisiopatologia do TB. A descoberta de biomarcadores poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e auxiliar no diagnóstico e avaliação do prognóstico do transtorno. Os estudos ainda são limitados devido à complexidade da neurobiologia das funções cerebrais e às dificuldades éticas e práticas de avaliar o cérebro humano *in vivo* (Nestler e Hyman, 2010). Uma das ferramentas que podem auxiliar nessa etapa é através da pesquisa usando modelos animais de transtornos psiquiátricos, que têm sido relevantes para desvendar a fisiopatologia dessas condições (Howland et al., 2019).

1.5 MODELOS ANIMAIS DE TB

Pesquisas realizadas com modelos animais de TB ajudaram a descobrir as vias envolvidas em seu desenvolvimento. Para se validar um modelo animal de transtornos psiquiátricos, é necessário a presença de três critérios: validade de face, validade de construção e validade preditiva (Mack et al., 2019). A validade de face é a habilidade que o modelo tem em mimetizar um sintoma do transtorno; validade de constructo (ou construção) é a capacidade

do modelo na produção de alguma alteração fisiopatológica observada no transtorno; validade preditiva é a capacidade de fármacos clássicos, usados no tratamento do transtorno, prevenir e/ou reverter os sintomas induzidos no modelo (Machado-Vieira et al., 2004).

1.5.1 Validade de face

Para se avaliar a validade de face do TB são utilizados testes comportamentais, que incluem o teste de natação forçada, teste do consumo de sacarose e teste de campo aberto (Valvassori et al., 2013). A descrição do teste de natação forçada foi descrito pela primeira vez por Porsolt e colegas (1977) e ainda hoje é um dos testes comportamentais mais utilizados para a avaliação dos efeitos antidepressivos de substâncias, e para avaliar o comportamento tipo-depressivo em modelos animais de depressão. Os roedores, que podem ser ratos ou camundongos, são alocados em um tanque cilíndrico, com volume de água no qual não possam tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Após um tempo os animais percebem a impossibilidade de sair do local e adotam uma postura de imobilidade, sendo então avaliado a juntamente com o tempo de natação do animal. A imobilidade no teste de natação forçada é interpretada como uma manifestação de humor negativo, representando desesperança no animal, refletindo a falta de motivação, que é um dos critérios sintomáticos presente no episódio depressivo (Figura 3).

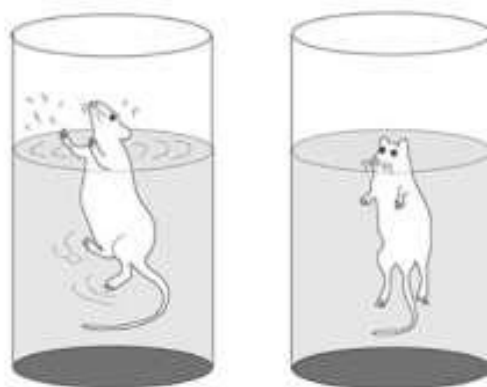


Figura 3: Teste de natação forçada. No primeiro cilindro o roedor ainda no período de tentativa de escape. No segundo cilindro o animal já no período de imobilidade, interpretado como uma manifestação de humor negativo (Adaptado de Kuteeva et al., 2010).

Outro teste bastante utilizado para avaliação de sintomas depressivos é através da avaliação da ingestão de sacarose. A redução no consumo de líquidos ou alimentos palatáveis, em animais experimentais, representa o sintoma de anedonia observado em humanos. Anedonia é a perda do interesse ou prazer em realizar atividades diárias, e é um dos critérios para o

diagnóstico do Episódio Depressivo de acordo com o DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013).

Já para avaliação dos episódios de mania em animais, o teste mais utilizado é o teste de campo aberto. Esse teste foi desenvolvido por Hall e Ballachey em 1932, e avalia a atividade exploratória e locomotora em roedores (Hall e Ballachey, 1932). Alterações comportamentais induzidas por psicoestimulantes têm sido amplamente utilizado como um modelo animal de mania, pois provocam agitação psicomotora, que é um dos sintomas presentes durante esses episódios. A atividade locomotora então é facilmente avaliada em ratos e camundongos utilizando o teste de campo aberto (Figura 4) (Prut e Belzung, 2003).

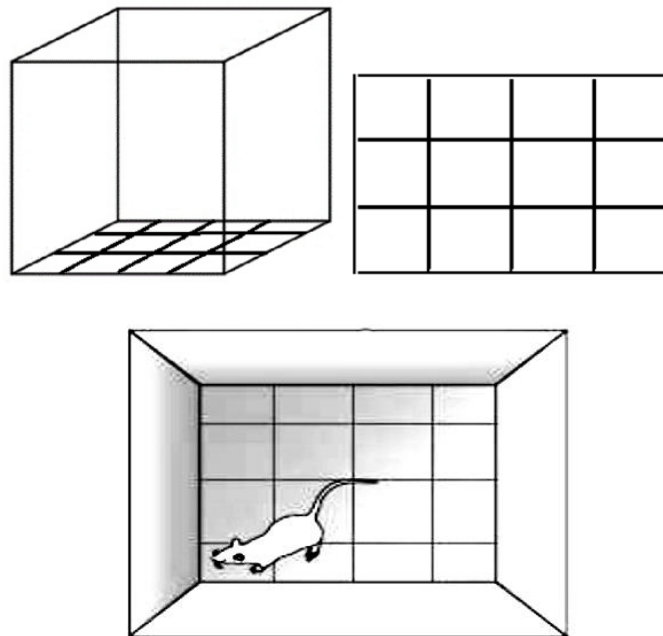


Figura 4: Teste de campo aberto. A atividade locomotora é contabilizada através do número de cruzamentos das linhas por cada animal e pela atividade exploratória - momento em que o roedor se erguia sobre as patas traseiras, terminando quando uma ou ambas as patas anteriores tocavam o chão novamente (Adaptado de Rozisky et al., 2014).

1.5.2 Validade de constructo

Esse critério exige a semelhança entre a interpretação teórica do modelo e os conhecimentos sobre a neurobiologia do transtorno. Uma das alterações fisiológicas da depressão é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Quando submetidos ao estresse, vários neurotransmissores, incluindo norepinefrina, acetilcolina e GABA, regulam a secreção do fator de liberação da corticotrofina (CRF), o qual é liberado a partir de células do hipotálamo. O CRF controla a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), produzido na hipófise e liberado na corrente sanguínea. O ACTH, por sua vez, age sobre a glândula adrenal

para aumentar a secreção de cortisol e outros glicocorticóides, os quais possuem um papel fundamental na resistência ao estresse. O cortisol também pode agir inibindo a secreção do CRF, resultando em feedback negativo da secreção do ACTH (Cowen, 2002). Essas alterações podem estar compatíveis no episódio depressivo do TB.

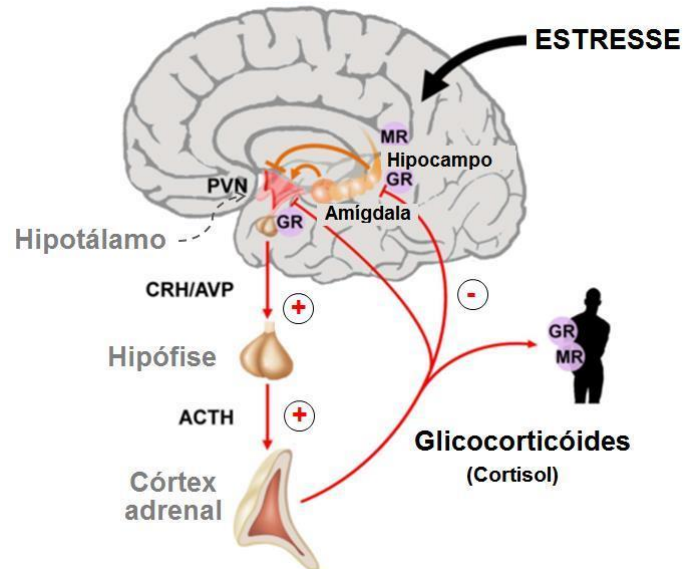


Figura 5: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A exposição ao estresse promove a ativação do eixo HHA. Situações de estresse fazem com que o hipotálamo libere o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH estimula o córtex adrenal a secretar o cortisol (Adaptado de Raable e Spengler, 2013).

Disfunções na regulação de íons têm sido identificadas em pacientes bipolares. Adicionalmente, estudos sugerem que mania e depressão bipolar estão relacionadas com aumento intracelular de Na^+ (Coppen et al., 1966; Shaw, 1966). Juntos, estes estudos sugerem que a diminuição do transporte de íons através da membrana pode estar envolvida neste transtorno. Estudos sugerem que alterações na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ estão presentes no TB, como sua diminuição em eritrócitos de pacientes, tanto na fase de mania quanto na fase depressiva, quando comparados com os pacientes bipolares que estavam em eutímia (Looney e El-Mallakh, 1997; Roberts, 2010). A concentração elevada de sódio no meio intracelular ocorre devido à inativação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em células derivadas de pacientes bipolares (Li e El-Mallakh, 2004; Roberts, 2010; Banerjee et al., 2012). Sendo assim, essas duas alterações fisiológicas são frequentemente replicadas para cumprir a validade de constructo em modelos animais do TB.

1.5.3 Validade preditiva

Baseia-se no isofarmacológico, quando um fármaco é efetivo na clínica e também no modelo animal (McGonigle, 2014). A avaliação desse critério é feita com base

nos efeitos da administração de fármacos usados classicamente na terapêutica. Nesse aspecto, o carbonato de Li tem usado preferencialmente para avaliar a validade preditiva dos modelos de mania (O'Donnell e Gould, 2007), pois ele é capaz de reduzir sintomas maníacos, bem como prevenir ciclagens entre mania e depressão (Lyon, 1991; Muller-Oerlinghausen et al., 2002).

O Li é utilizado para o TB desde 1949 (Cade, 1949), e ainda hoje é uma medicação de primeira linha para o seu tratamento (Yatham et al., 2018). Seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. No entanto, as revisões sugerem que o efeito geral do Li é a estimulação da neurotransmissão inibitória e inibição da neurotransmissão excitatória (Kamali et al., 2017). Além disso, o Li também parece aumentar a neurogênese e os fatores neuroprotetores e, em portadores de TB, pode preservar ou aumentar a substância cinzenta cortical, integridade da substância branca e estruturas límbicas, como hipocampo, tálamo e amígdala (Hajek et al., 2012; López-Jaramillo et al., 2017; Powell et al., 2018). Esses efeitos podem ser consequência de seus efeitos anti-inflamatórios, os quais vêm sendo estudados desde o início da década de 70. A interação entre o Li e o sistema imunológico é complexa, e em alguns estudos demonstram que há supressão da expressão da ciclooxigenase-2, inibição da produção de IL-1 β e TNF- α e aumento de IL-2 e IL-10 (Nassar e Azab, 2014; Maddu e Raghavendra, 2015).

Considerando todos os aspectos exigidos para a validação de um modelo animal, observamos a importância dessa ferramenta para o estudo da fisiopatologia de transtornos psiquiátricos. A execução de um modelo animal de TB é um desafio para a comunidade científica, pois apresenta um curso clínico complexo, com alterações de humor recorrentes, incluindo episódios maníacos, depressivos e com características mistas (Machado-Vieira et al., 2004). Recentemente, Valvassori e colaboradores (2019) forneceram todas as validades necessárias para um modelo animal adequado de TB usando esta mesma plataforma, através da administração intracerebroventricular (ICV) de ouabaína (OUA) uma vez que mimetiza comportamentos maníacos e depressivos em um mesmo animal, bem como as alterações relativas à fisiopatologia e remissão dos sintomas por meio da tradicional farmacoterapia

1.6. MODELO ANIMAL DE TB INDUZIDO POR OUABAÍNA

A OUA é um conhecido glicosídeo que inibe a enzima sódio e potássio de adenosina trifosfatase (Na⁺K⁺ATPase; EC 3.6.3.9) (Yu et al., 2011). De fato, a evidência mostrou uma atividade significativamente prejudicada da Na⁺K⁺ATPase em pacientes bipolares em episódios maníacos e depressivos (Banerjee et al., 2012). O modelo de OUA para o TB parece ser o único modelo animal disponível que demonstra as três validades para um modelo

animal adequado das alterações longitudinais do TB. Segundo estudo de Valvassori et al. (2019) foram observados comportamentos do tipo-maniaco 7 dias após a administração de OUA, e comportamentos do tipo-depressivo 14 dias após a administração desse composto (validade de face). As alterações fisiopatológicas encontradas no modelo cumprem a validade preditiva: aumento dos níveis de ACTH no sangue e aumento do peso da glândula adrenal, 14 dias após a administração de OUA, período no qual os animais apresentavam comportamento tipo-depressivo, bem como alterações nas vias de BDNF e dano cognitivo. Por fim, confirmando a validade de constructo, a administração de Li e VPA reverteu os sintomas do tipo-maniaco. Além disso, a administração de Li, VPA, do antidepressivo imipramina (IMI) ou o tratamento adjunto desses medicamentos, Li ou VPA com IMI reverteram os comportamentos tipo-depressivos nos animais bem como houve reversão dos danos a lipídeos induzidos pela OUA (Valvassori et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações neuroinflamatórias induzidas por OUA em cérebros de ratos submetidos ao modelo animal de TB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o número de cruzamentos e levantamentos dos animais através do teste do campo aberto 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar o tempo de imobilidade dos animais através do teste de natação forçada 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar os níveis de IL-1 β no córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar, 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar os níveis de IL-6 no córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar, 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar os níveis de IL-10 no córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar, 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar os níveis de TNF- α no córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar, 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.
- Avaliar os níveis de CINC-1 no córtex frontal e hipocampo de ratos Wistar, 7 e 14 dias após a administração ICV de OUA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram iniciados após a aprovação da Comissão de Ética sobre Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) (protocolo nº 66/2010), de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (US) “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (2011) além das recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Trinta e dois ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus*, cepa heterogênica), com peso corporal de 250–350 g, foram obtidos na colônia de reprodução da UNESC. Os animais foram alojados em cinco por gaiola, com comida e água *ad libitum* e condições controladas (ciclo claro / escuro de 12 h; luzes acesas às 6:00 da manhã; 22 ± 1 ° C).

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram submetidos à anestesia por injeção intramuscular de cetamina (80 mg / kg peso corporal) e xilazina (10 mg / kg), e posteriormente acomodados em aparelho estereotáxico. Em seguida, foi feita a retirada da pele e pelos que recobrem a cabeça. Após isso, foi colocada uma cânula-guia [calibre 27 (9 mm)] na superfície do osso craniano, de acordo com as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma; 1,5 mm à direita da linha média; e 1 mm acima do ventrículo cerebral lateral (Paxinos e Watson, 2013). Após a marcação, foi feito um orifício de 2 mm no crânio do animal, sendo implantada uma cânula ventralmente 2,6 mm na superfície superior do osso e fixada comacrílico dentário.

Os animais se recuperaram do procedimento em 72h, tempo em que receberam cloridrato de tramadol (10 mg / kg de peso corporal) por via subcutânea a cada 12 h para amenizar a dor pós-operatória, seguindo as instruções do fabricante (União Química Farmacêutica Nacional SA, São Paulo, Brasil).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

No quarto dia após o procedimento cirúrgico, uma cânula calibre 30 foi colocada dentro da cânula guia e ligada a uma seringa por meio de tubo de polietileno. A ponta da cânula de infusão estendeu-se 1,0 mm além da cânula guia para alcançar o ventrículo cerebral lateral direito. Cada animal recebeu uma única injeção ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa, 5 μ L) ou OUA (10^{-3} M) dissolvido em LCRa (5 μ L). Cada infusão durou 30 segundos para evitar o efluxo de líquido (el-Mallakh e Wyatt, 1995; Riegel et al., 2009). Após a injeção de LCRa ou OUA, os animais receberam injeções intraperitoneais de solução salina (Sal, 0,9% 1 mL / kg) ou Li (47,5 mg / kg, 1mL / kg) duas vezes ao dia, durante 14 dias (Jornada et al., 2010). Os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n = 8 por grupo): 1) LCRa + Sal, 2) LCRa + Li, 3) OUA + Sal e 4) OUA + Li (Figura 6).

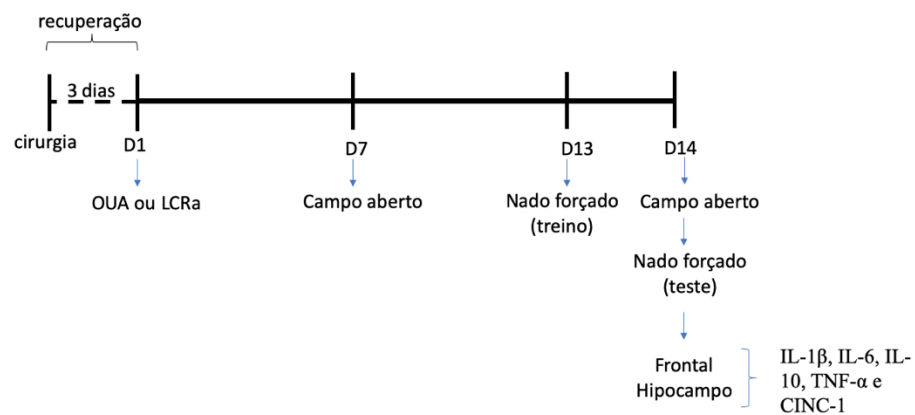


Figura 6: Desenho experimental. Cada animal recebeu uma única injeção ICV de líquido cefalorraquidiano artificial (LCRa, 5 μ L) ou OUA (10^{-3} M). Após a injeção de LCRa ou OUA, os animais receberam injeções intraperitoneais de solução salina (Sal, 0,9% 1 mL / kg) ou Li (47,5 mg / kg, 1mL / kg) duas vezes ao dia, durante 14 dias (Jornada et al., 2010). Os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n = 8 por grupo): 1) LCRa + Sal, 2) LCRa + Li, 3) OUA + Sal e 4) OUA + Li para então serem avaliados nos testes comportamentais e estruturas cerebrais (frontal e hipocampo).

3.4.1 Testes comportamentais

3.4.1.1 Campo aberto

O teste de campo aberto ocorreu em dois períodos: 7 e 14 dias após as infusões de ICV, para fornecer informações criteriosas sobre a locomoção, comportamentos exploratórios, e também comportamentos de risco e estereotipados dos animais. Resumidamente, o teste foi executado em um aparato com chão de 40 x 60 cm, cercado por paredes de compensado marrom com 50 cm de altura e uma parede frontal de vidro. O chão foi dividido em nove retângulos

iguais por linhas pretas e coberto com uma base de vidro. Cada animal foi gentilmente colocado no retângulo traseiro esquerdo para explorar a arena por 5 minutos (min). A hiperatividade indica um comportamento do tipo-maníaco, observada através do número total de cruzamentos (atividade locomotora) e levantamentos (atividade exploratória) durante todo o período de teste (Broadhurst, 1960).

3.4.1.2 Natação forçada

O procedimento realizado para investigar a imobilidade do animal (imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora d'água), que é um comportamento do tipo depressivo. O teste ocorreu em dois dias de procedimentos, onde na sessão de treino (13 dias após o ICV), cada rato foi colocado em um cilindro com água (23 °C) em quantidade suficiente para que não possa apoiar a ponta da cauda no fundo nem escapar do aparato, para habituarem com a condição de natação, durante 15 min. Na sessão de treino, nenhum parâmetro foi avaliado. Vinte e quatro horas após o treinamento, ocorreu a sessão de teste na qual foram avaliados os tempos de natação, escalada e imobilidade, por 5 min (Porsolt et al., 1977).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Amostras biológicas

No 14º dia após a infusão de OUA ou LCRA, após os testes comportamentais, os ratos foram submetidos à eutanásia através de decapitação por guilhotina. O cérebro foi dissecado em córtex frontal e hipocampo. As amostras foram colocadas em nitrogênio líquido e posterior armazenamento a -80 ° C para posterior análise bioquímica.

3.5.2 Parâmetros de neuroinflamação

3.5.2.1 Quantificação de proteína

A proteína total foi medida pelo método de Lowry e colegas de trabalho (1951), com ligeiras modificações (Peterson, 1977). Albumina de soro bovino foi usada como padrão.

3.5.2.2 Níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CINC-1

O hipocampo e o córtex frontal foram homogeneizados em uma solução extratora contendo aprotinina (100 mg de tecido por 1 mL). A concentração de citocinas / quimiocinas foi determinada nas estruturas cerebrais usando ensaios ELISA comercialmente disponíveis, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R&D Systems, MN, Estados Unidos). Os dados foram expressos como pg / 100 mg de tecido.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, utilizando o software Statistica 7[®], e para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Graph Prism 5[®]. Quando o valor de F foi significativo, comparações post hoc foram feitas pelo teste de Tuket. A significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a locomoção dos ratos. Os parâmetros avaliados incluíram o número de cruzamentos e levantamentos Sete dias após os ratos terem recebido uma única injeção ICV de OUA, eles apresentaram um padrão marcante de locomoção em comparação aos animais do grupo LCRa (Figura 6). A administração de Li reverteu o aumento no número de cruzamentos (6A) e levantamentos (6B) induzidos por OUA. A ANOVA de duas vias revelou efeitos OUA significativos nos sete dias seguintes após as infusões de ICV [Crossings: $F(1,36) = 143,90$, $p < 0,05$; Rearings: $F(1,36) = 71,61$, $p < 0,05$] e tratamento [Crossings: $F(1,36) = 118,35$, $p < 0,05$; Criação: $F(1,36) = 66,54$, $p < 0,05$].

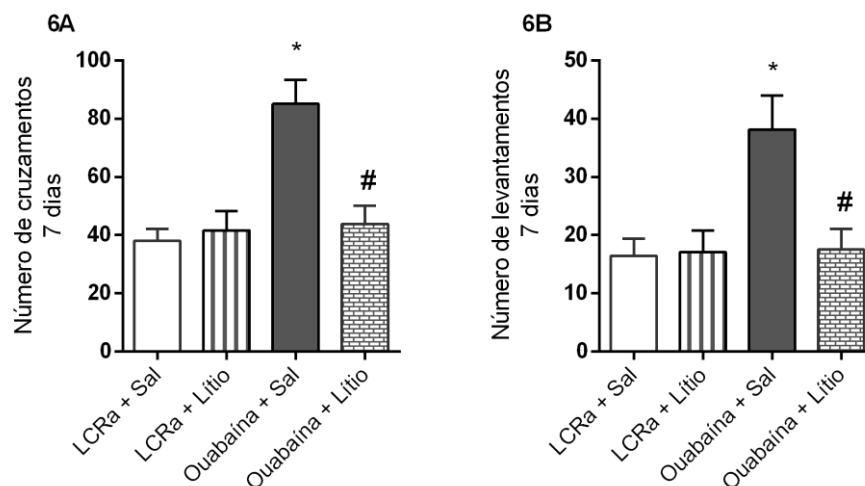


Figura 7: Efeitos da administração de Li sobre o número de cruzamentos (A) e levantamentos (B) de animais submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA 7 dias após o ICV ($n=10$ por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo LCRa. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo OUA.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nesses parâmetros nos ratos avaliados 14 dias após a infusão de OUA (Figura 7A e 7B) [Crossings: $F(1,36) = 10,02$, $p = 0,003$; Rearings: $F(1,36) = 0,243$, $p = 0,62$] e tratamento [Crossings: $F(1,36) = 0,22$, $p = 0,640$; Rearings: $F(1,36) = 0,007$, $p = 0,93$]. Assim, a avaliação desse comportamento no 14º após a injeção de OUA revelou que os ratos não exibiam o comportamento maníaco observado no 7º dia.

A próxima etapa das avaliações comportamentais foi o teste de nado forçado. Nesse contexto, foi demonstrado um aumento significativo no tempo de imobilidade (em segundos) em 14 dias após a administração do OUA (Figura 7C e 7D). Além disso, houve uma diminuição significativa no tempo de natação (segundos) nos ratos nesse mesmo teste. Em conjunto, esses resultados demonstram que, após 14 dias da administração de OUA, os animais apresentaram desesperança, que é um comportamento do tipo depressivo. Por outro lado, a administração de Li reverteu o aumento da imobilidade induzida por OUA (Figura 6) [Imobilidade: $F(1,36) = 301,06$, $p < 0,05$; Natação: $F(1,36) = 301,06$, $p < 0,05$] e tratamento [Imobilidade: $F(1,36) = 301,06$, $p < 0,05$; Natação: $F(1,36) = 301,06$, $p < 0,05$].

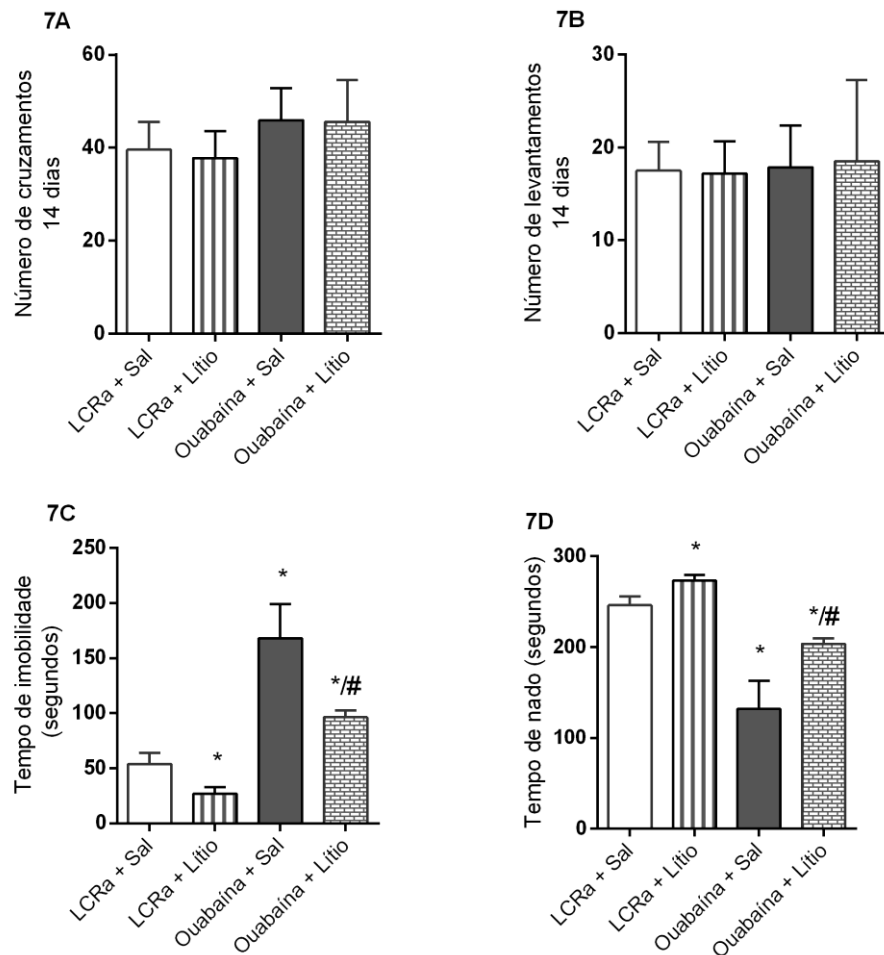


Figura 8: Efeitos da administração de Li sobre o número de cruzamentos (A) e levantamentos (B), tempo de imobilidade (C) e de natação (D) de animais submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n=10 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo LCRa. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo OUA.

4.2 PARÂMETROS DE NEUROINFLAMAÇÃO

No 14º dia após a injeção de OUA, foram realizadas as medidas neuroquímicas, com investigação do efeito do tratamento com Li neste cenário experimental. Os dados representados nas figuras a seguir mostram alterações significativas nos níveis de IL-1 β (Figura 8), IL-6 (Figura 9), IL-10 (Figura 10), TNF- α (Figura 11) e CINC-1 (Figura 12) em ratos submetidos ao modelo animal de TB induzido por OUA. Uma única administração de OUA desencadeou o aumento dos níveis de todos os parâmetros da inflamação, independentemente da estrutura cerebral, enquanto a administração de Li reverteu essa alteração.

Os dados da ANOVA de duas vias revelaram efeitos significativos da administração de OUA nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (8A) e hipocampo (8B) dos animais [córtex frontal: $F(1,16) = 30,95$, $p = 0,002$; hipocampo: $F(1,16) = 70,55$, $p < 0,05$], bem como tratamento [córtex frontal: $F(1,16) = 71,96$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,16) = 67,94$, $p < 0,05$], e uma administração significativa de OUA \times interação de Li [córtex frontal: $F(1,48) = 45,24$, $p = 0,15$; hipocampo: $F(1,47) = 41,63$, $p < 0,05$]. O mesmo padrão de alterações foi observado nos níveis de IL-6 em relação ao efeito de OUA [córtex frontal: $F(1,16) = 38,82$, $p = 0,002$; hipocampo: $F(1,16) = 32,12$, $p < 0,05$], tratamento [córtex frontal: $F(1,16) = 69,34$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,16) = 51,60$, $p < 0,05$], bem como uma administração OUA significativa \times interação Li [córtex frontal: $F(1,48) = 49,31$, $p = 0,15$; hipocampo: $F(1,47) = 27,11$, $p < 0,05$].

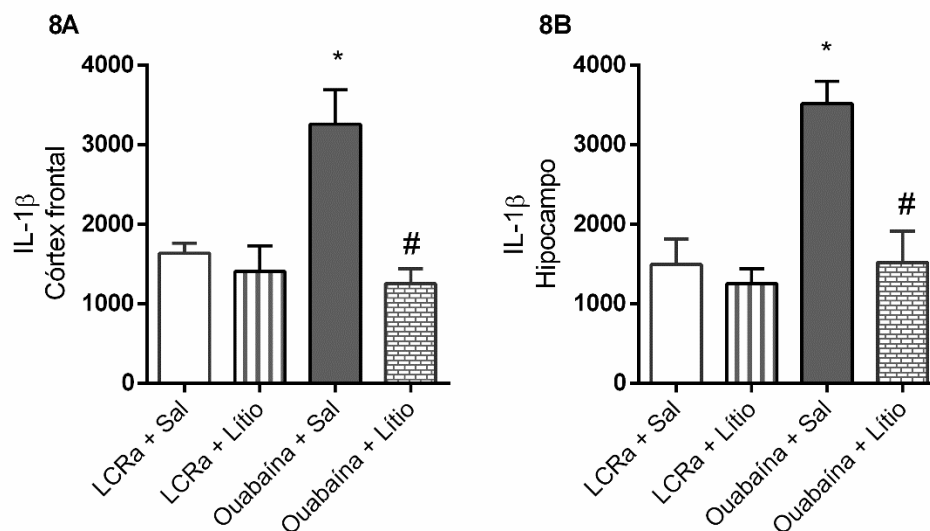


Figura 9: Efeitos da administração do Li sobre os níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA ($n = 6$ por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo LCRa. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo OUA.

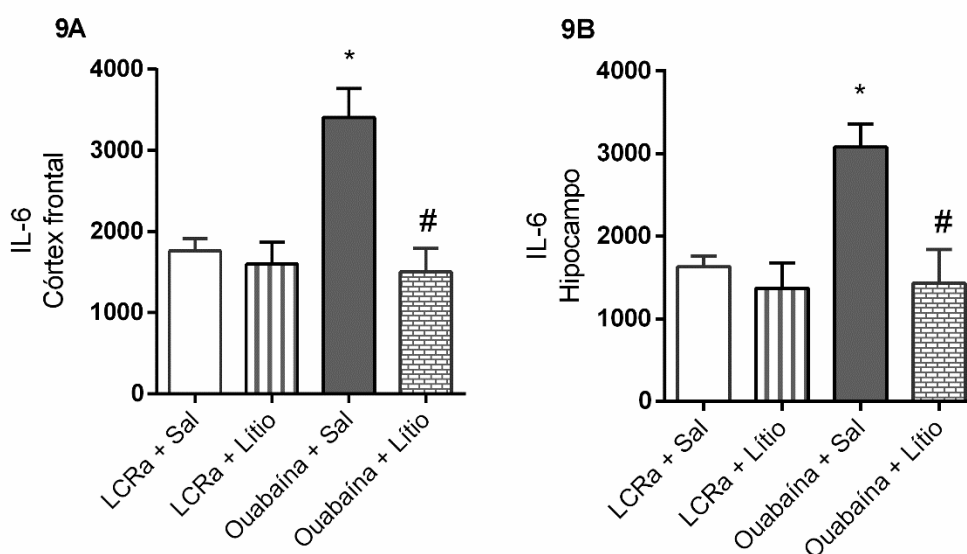


Figura 10: Efeitos da administração do Li sobre os níveis de IL-6 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo LCRa. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo OUA.

Além disso, um conjunto semelhante de alterações foi observado nos níveis de IL-10, no que diz respeito ao efeito da OUA (Figura 10A e 10B) [córtex frontal: $F(1,16) = 15,09$, $p = 0,001$; hipocampo: $F(1,16) = 8,71$, $p = 0,009$], tratamento [córtex frontal: $F(1,16) = 1,81$, $p = 0,197$; hipocampo: $F(1,16) = 17,17$, $p < 0,05$], bem como uma administração OUA \times interação Li [córtex frontal: $F(1,48) = 9,26$, $p = 0,007$; hipocampo: $F(1,47) = 19,38$, $p < 0,05$]. O mesmo padrão pode ser observado nos níveis de TNF- α (11A e 11B) (Figura, em relação aos efeitos de OUA [córtex frontal: $F(1,16) = 7,75$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,16) = 33,73$, $p < 0,05$], tratamento [córtex frontal: $F(1,16) = 1,81$, $p = 0,197$; hipocampo: $F(1,16) = 10,61$, $p < 0,05$], bem como a administração de OUA \times interação de Li [córtex frontal: $F(1,48) = 19,06$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,47) = 15,83$, $p < 0,05$]. Por fim, os níveis de CINC-1 seguiram o mesmo padrão demonstrado acima, considerando os efeitos de OUA (12A e 12B) [córtex frontal: $F(1,16) = 22,75$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,16) = 7,71$, $p = 0,013$], tratamento [córtex frontal: $F(1,16) = 17,02$, $p < 0,05$; hipocampo: $F(1,16) = 6,95$, $p = 0,017$], e a administração OUA \times interação Li [córtex frontal: $F(1,48) = 15,73$, $p = 0,001$; hipocampo: $F(1,47) = 15,11$, $p = 0,001$].

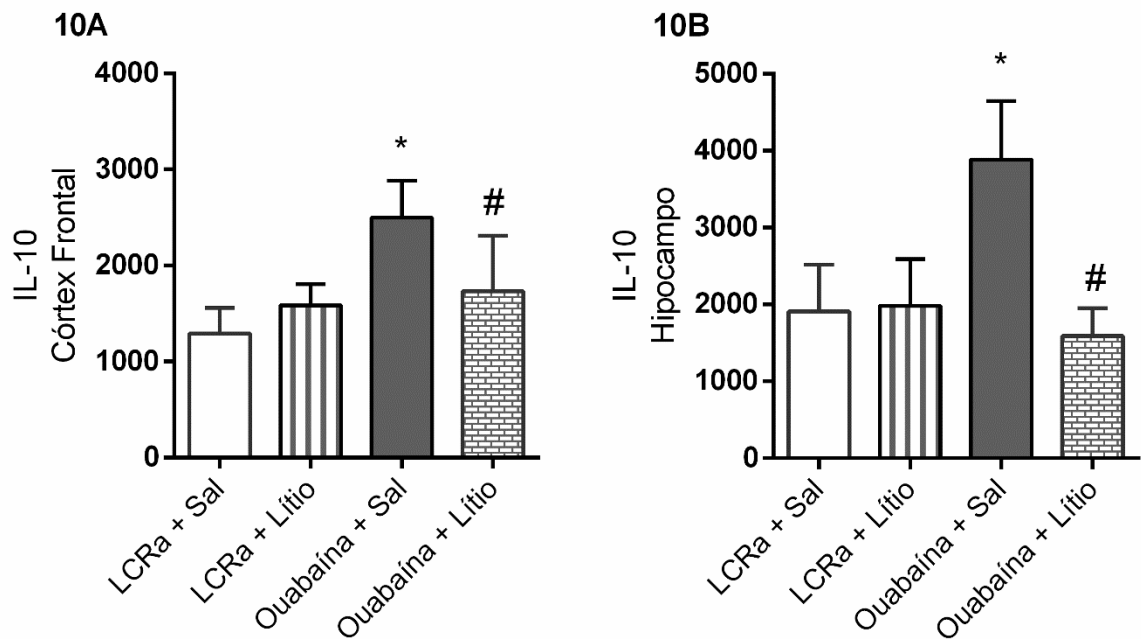


Figura 11: Efeitos da administração do Li sobre os níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média ± erro padrão. *p ≤ 0.05 comparado ao grupo LCRa. #p ≤ 0.05 comparado ao grupo OUA.

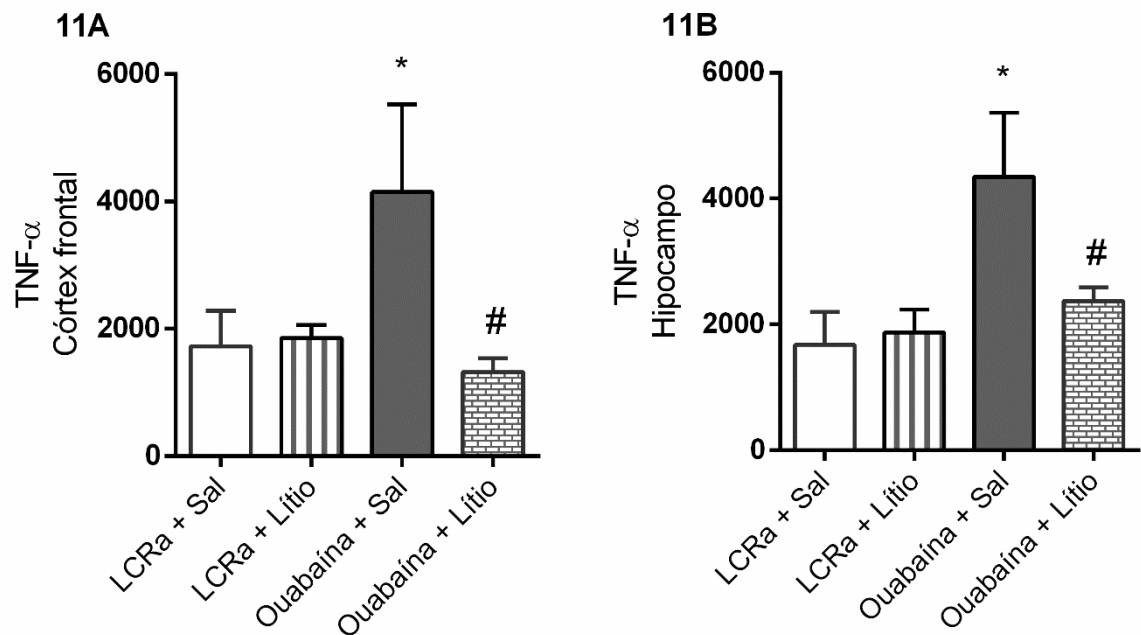


Figura 12: Efeitos da administração do Li sobre os níveis de TNF-α no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA (n = 6 por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média ± erro padrão. *p ≤ 0.05 comparado ao grupo LCRa. #p ≤ 0.05 comparado ao grupo OUA.

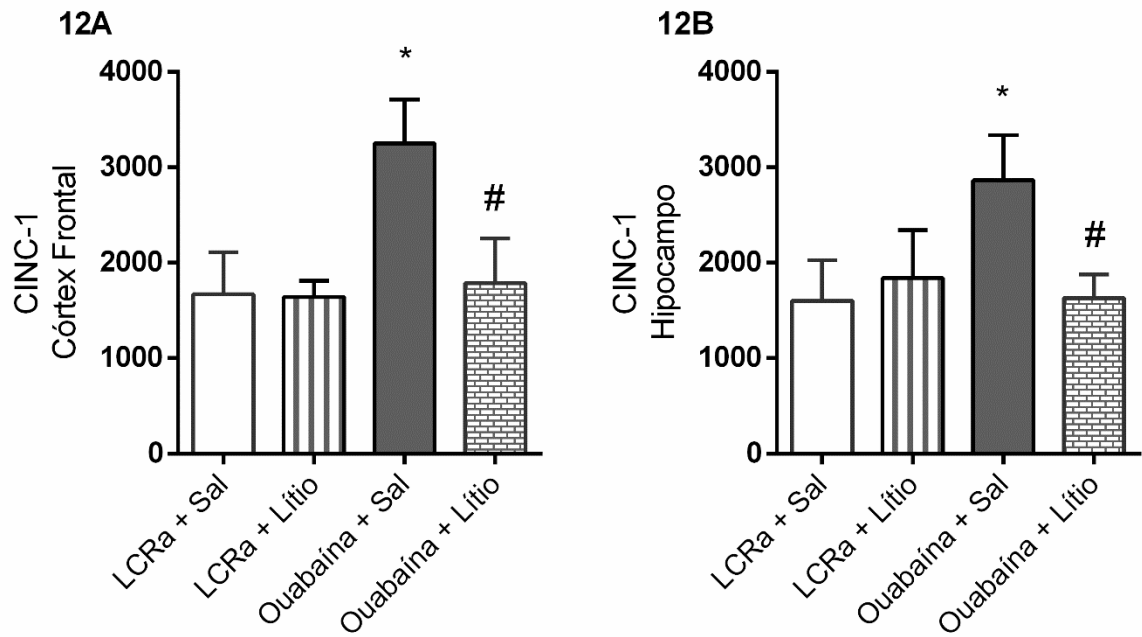


Figura 13: Efeitos da administração do Li sobre os níveis de CINC-1 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por OUA ($n = 6$ por grupo). Dados analisados por ANOVA de duas vias seguido por post-hoc de Tukey quando F apresentou valor significativo. Valores expressos como média \pm erro padrão. * $p \leq 0.05$ comparado ao grupo LCRa. # $p \leq 0.05$ comparado ao grupo OUA.

5 DISCUSSÃO

O TB é uma condição médica extremamente complexa, de causas multifatoriais e com consequências catastróficas para seu portador. Mesmo com essa relevância, persiste como sendo um dos transtornos com a fisiopatologia menos conhecida até o momento. O presente estudo levou em consideração que a investigação de suas bases biológicas é fundamental para aumento das possibilidades terapêuticas e diagnóstico mais precoce e preciso, com o objetivo de prevenção de danos subsequentes. Sendo assim, uma das maneiras que se pode investigar mais sobre o TB é através dos modelos animais. O presente estudo avaliou alguns parâmetros semelhantes àqueles observadas nos pacientes com TB, desde alterações comportamentais até alterações bioquímicas, a fim de auxiliar em uma melhor compreensão acerca da fisiopatologia do transtorno.

Devido à subjetividade dos sintomas – a anamnese ainda é o principal instrumento para seu diagnóstico, e reforçado pelo fato de que até o presente momento não há exames complementares específicos para sua detecção – a construção de modelos animais ainda é extremamente complexa, mas de fundamental importância. Conforme já citado anteriormente, ao se formular um modelo animal de transtornos psiquiátricos, deve-se seguir a validação de três critérios principais: a validade de face, validade de constructo (ou construção) e validade preditiva. A validade de face consiste em apresentar manifestações comportamentais semelhantes às observadas em humanos (Ellenbroek e Cools, 1990). Considerando que as manifestações comportamentais observadas no TB consistem principalmente em episódios de mania e depressão (American Psychiatric Association, 2013), um modelo animal adequado para o estudo do TB deve mimetizar, em um mesmo animal, alterações comportamentais características desses dois episódios. A maioria dos modelos animais existentes focam na indução separadamente de comportamentos que mimetizam a mania, como pela indução de anfetaminas, ou a depressão, como por privação de sono (Valvassori et al., 2013).

No presente estudo foi observado que a OUA induziu um aumento da atividade locomotora e exploratória dos animais sete dias após o ICV, observados através do teste do campo aberto, demonstrando uma hiperatividade, condizente com uma das alterações observadas em um episódio de mania de um paciente com TB. Além do estudo realizado por Valvassori et al. (2019a), os resultados do presente estudo são semelhantes aos dados fornecidos por outros artigos, especialmente no contexto de comportamentos maníacos após sete dias da injeção do inibidor $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Amodeo et al., 2017; Wang et al., 2018; Dal-Pont et al., 2019; Lopachev et al., 2019; Zhang et al., 2019; Varela et al., 2020). Além disso, no presente

estudo foi observado que, 14 dias pós a administração ICV, os animais apresentaram um aumento no tempo de imobilidade e uma redução o tempo de natação, observados através do teste de natação forçada, caracterizando alterações comportamentais do tipo-depressivas. Semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, nosso grupo de pesquisa (Valvassori et al., 2019a) também mostrou que após 14 de administração ICV de OUA, os ratos apresentaram aumento no tempo de imobilidade e redução no tempo de natação no teste de natação forçada, demonstrando comportamento do tipo-depressivo. O modelo OUA, que foi recentemente validado pelo artigo de Valvassori e colaboradores (2019a), é o único até o presente momento que consegue mimetizar ambas as fases do TB em um único modelo, mimetizando de maneira mais completa o ciclo maníaco-depressivo do transtorno tal como ocorre em humanos. Essa avaliação longitudinal poderá facilitar o estudo desse transtorno e aperfeiçoar o desenvolvimento e o teste de novas alternativas terapêuticas. De fato, em pacientes bipolares, os episódios de mania duram pelo menos sete dias, enquanto os sintomas depressivos estão presentes dentro de 14 dias nos mesmos indivíduos (American Psychiatric Association, 2013). Esse padrão é representado com precisão no modelo OUA. Portanto, pode-se dizer que o presente estudo conseguiu contemplar a validade de face do modelo, uma vez que foi capaz de mimetizar os sintomas das fases de mania e depressão, as quais caracterizam o TB.

A validade de construção de um modelo animal de transtornos psiquiátricos é descrita como a capacidade do modelo em mimetizar, uma ou mais alterações fisiopatológicas, observadas naquele transtorno (Ellenbroek e Cools, 1990). É descrito na literatura que pacientes com TB, tanto em episódios de mania quanto episódios de depressão, apresentam alterações na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Banerjee et al., 2012). No presente estudo, foi observado que, após a administração ICV de OUA, composto inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, os animais apresentaram, após 7 dias, comportamentos do tipo-maníaco, e após 14 dias, comportamentos do tipo-depressivo. Uma possível limitação do presente estudo é que a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ não foi medida para confirmar que os efeitos de OUA estão relacionados a uma inibição dessa enzima. Ao considerar que a atividade da enzima é fundamental para muitos papéis neuronais, uma diminuição estável neste parâmetro pode gerar alterações neurológicas (Clausen et al., 2017; Wagoner e Dill, 2019), de modo que a proteína pode estar em conformidade com a alta concentração de OUA para evitar a interrupção de suas funções. Outra possibilidade é o fato do efeito do glicosídeo na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ser independente da atividade de transporte iônico da proteína; em vez disso, a droga pode ativar um complexo de sinalização compreendendo a

enzima, o determinante de agrupamento 36 (CD36) e o receptor Toll-like 4, posteriormente desencadeando a inflamação conduzida por fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Chen et al., 2017).

A inflamação tem sido cada vez mais relatada em pesquisas com foco na fisiopatologia e terapia do TB, ambos em ensaios clínicos (Chen et al., 2014; Kargar et al., 2014; Chang et al., 2017; Edberg et al., 2018; Savitz et al., 2018) e estudos em animais (Han et al., 2018; Abu-Rish et al., 2018; Zhang et al., 2019). Em pacientes bipolares, mediadores inflamatórios têm sido implicados no transtorno, potencialmente influenciando a progressão ou gravidade (Lee et al., 2013; Kemp et al., 2014; Dolsen et al., 2018). Por exemplo, as citocinas cujos níveis podem estar aumentados em pacientes com TB, em comparação com controles saudáveis, incluem IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α (Modabbernia et al., 2013; Teixeira et al., 2016). Além disso, o uso de anti-inflamatórios como terapia adjuvante para estabilizadores de humor no contexto da mania bipolar tem demonstrado resultados promissores (Arabzadeh et al., 2015; Mousavi et al., 2017; Edberg et al., 2018; Valvassori et al., 2019b; Zhang et al., 2019). O presente estudo enfocou a necessidade de modelar a perspectiva pró-inflamatória do TB. Para este objetivo, foram avaliados os níveis de mediadores inflamatórios relevantes (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e CINC-1) 14 dias após as infusões de OUA ICV. Uma possibilidade é que OUA possa ativar as vias de sinalização neuronal que regem a liberação de citocinas, como o NF- κ B, que é ativado pelo glicosídeo de acordo com estudos anteriores (de Sá Lima et al., 2013; Chen et al., 2017). Além disso, a suprarregulação de NF- κ B foi detectada em pacientes bipolares, potencialmente contribuindo para o equilíbrio pró-inflamatório do transtorno (Amoruso et al., 2015; Elhaik e Zandi, 2015; Miklowitz et al., 2016; Bioque et al., 2019). Nesse sentido, será de grande interesse que um modelo animal de TB, além de mimetizar as alterações comportamentais do transtorno, também recapitule as alterações inflamatórias que podem ocorrer em pacientes bipolares, o que evidencia a necessidade de novas pesquisas nessa área. Os dados fornecidos pelo estudo mimetizam as alterações fisiopatológicas inflamatórias relatadas em pacientes (Kim et al., 2007; Kunz et al., 2011; Uyanik et al., 2015; Miklowitz et al., 2016), o que reforça a validade de construção do modelo para simular os aspectos fisiopatológicos do TB.

A validade preditiva de um modelo animal consiste na capacidade do modelo em mimetizar o tratamento do transtorno, ou seja, a capacidade de um fármaco clássico do transtorno em reverter os respectivos sintomas (Ellenbroek e Cools, 1990). O presente estudo demonstrou que o tratamento com Li, padrão ouro no tratamento do TB, reverteu as alterações comportamentais induzidas pela administração de OUA sete dias após o ICV. Além disso, tais alterações não se perpetuam até 14 dias após as infusões de ICV, enquanto o teste de natação

forçada apresentou um comportamento do tipo depressivo (“desesperança”) nos mesmos animais neste período (também evitável por Li). Portanto, os resultados comportamentais observados no presente estudo reforçam a consistência da administração do OUA para modelar TB, o que é uma ferramenta para sua validação. A reversão desses padrões comportamentais através da administração de Li também corrobora para a validade preditiva do transtorno, já que Li é um medicamento de primeira linha para o tratamento tanto do episódio depressivo quanto para o episódio de mania do TB (Lakshmi et al., 2018). A tabela 1 mostra os resultados gerais das características mimetizadas no modelo animal de TB induzido por OUA, comparando com alterações características de pacientes com TB.

Modelo animal de TB induzido por OUA	Alterações observadas em pacientes	Alterações observadas nos animais
Validade de Face	<p><u>Episódios de mania:</u> Hiperatividade, agitação.</p> <p><u>Episódios depressivos:</u> Tristeza, sentimentos de culpa, apatia, desesperança.</p>	<p><u>Comportamentos do tipo-maníaco:</u> Aumento no número de cruzamentos e levantamentos no teste do campo aberto, mimetizando hiperatividade.</p> <p><u>Comportamentos do tipo-depressivo:</u> Aumento no tempo de imobilidade no teste de natação forçada, mimetizando desesperança.</p>
Validade de Construção	Alterações na atividade da Na ⁺ K ⁺ ATPase. Alterações nos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias.	Inibição da Na ⁺ K ⁺ ATPase através da administração de OUA. Alterações nos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias.
Validade Preditiva	Atenuação de sintomas através da administração de estabilizadores de humor e antidepressivos.	Reversão dos sintomas do tipo-maníaco e depressivos induzidos pela administração de OUA através da administração de Li.

Tabela 1: Alterações observadas no modelo animal de TB induzido pela administração ICV de OUA, comparadas com as alterações características nos episódios de mania e depressão em pacientes com TB. Li = Lítio; Na⁺K⁺ATPase = Sódio/potássio de adenosina trifosfatase; OUA = Ouabaína.

No presente estudo, tanto nos testes comportamentais quanto nos níveis de citocinas, a OUA provocou aumento significativo, enquanto a administração de Li reverteu essas alterações. Curiosamente, estudo semelhante realizado por nosso grupo de pesquisa

medindo as mesmas citocinas não encontrou alterações nesses parâmetros, exceto IL-6, cujos níveis foram diminuídos no estriado de ratos recebendo OUA (Tonin et al., 2014). No entanto, o trabalho de Tonin investigou o efeito OUA em um contexto agudo, e aqui os achados são apresentados em uma perspectiva subcrônica / crônica, com a inclusão do tratamento Li para fins de validação.

No estudo realizado por Tonin et al. (2014), não foram observadas alterações nos níveis de IL-1 β , IL-10, TNF- α e CINC-1 no córtex frontal, hipocampo, estriado e amígdala, além do soro e líquido cefalorraquidiano após a administração de OUA. De fato, resultados relacionados com a produção de IL-6 e IL-10 em células mononucleares de pacientes bipolares são conflitantes, uma vez que alguns estudos demonstram diminuição na produção dessas citocinas, e outros não apresentam alterações significativas (Boufidou et al., 2004; Liu et al., 2004; Knijff et al., 2007). Estudos anteriores demonstraram que a produção de IL-6 e TNF- α em células sanguíneas de pacientes em um episódio de mania foi significativamente maior quando comparados com controles saudáveis (Kim et al., 2007). Resultados contraditórios a respeito dos níveis de IL-1 β também aparecem na literatura, uma vez que alguns estudos demonstram que os níveis dessa citocina estão aumentados, e outros não demonstram diferença significativa em pacientes com TB (Söderlund et al., 2011; Mota et al., 2013; Kargar et al., 2014; Monfrim et al., 2014). Em relação a CINC-1, apenas o presente estudo e o de Tonin et al. (2014) avaliaram seus níveis em modelos animais de TB. No presente estudo foram observados aumentos nos níveis de CINC-1, enquanto o estudo de Tonin et al. (2014) não demonstrou diferença significativa. Essa diferença nos resultados encontrados nos níveis das citocinas, de forma geral, pode ser explicada, ao menos em parte, pelo fato de que o presente estudo avaliou os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e CINC-1 14 dias após o ICV de OUA, enquanto o outro estudo avaliou 7 dias após o ICV.

Foi demonstrado em estudos anteriores com modelos animais de mania, os quais são utilizados para estudar episódios de mania do TB, que a administração de anfetamina induz aumentos nos níveis de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF α , no soro, córtex frontal e estriado dos animais (Valvassori et al., 2015; 2017). Sugere-se que uma diminuição na síntese de dopamina (DA), ou então um aumento nos níveis de DA no citosol, pode levar a aumento ou diminuição da ativação da microglia (células de defesa do SNC) no estriado de animais experimentais (La Voie e Hastings, 1999; Thomas et al., 2008). É descrito que a administração ICV de OUA pode aumentar a liberação de DA no cérebro de ratos (Sui et al., 2013). Além disso, um estudo anterior demonstrou uma reversão dos aumentos de IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- α pelo Li em um modelo animal de mania dopaminérgico (Valvassori et al., 2015). Portanto, pode ser sugerido

que as alterações nos níveis das citocinas avaliadas no presente estudo, podem estar relacionadas com alterações nos níveis de DA, como consequência da administração de OUA. Além disso, sugere-se que os efeitos do Li no presente estudo podem também estar relacionados com modulações do sistema dopaminérgico.

Além disso, cabe ressaltar que no estudo de Tonin et al. (2014), houve uma diminuição de IL-6 no estriado sete dias após a administração ICV de OUA, onde os animais apresentaram comportamentos do tipo-maníaco. Em um outro estudo, utilizando células mononucleares de sangue periférico de humanos, foi mostrado que a OUA inibiu a produção de IL-6 das células (Matsumori et al., 1997). Matsumori et al. (1997) também mostrou que a OUA reduziu os níveis de IL-6 no sangue de animais experimentais. O presente estudo encontrou níveis aumentados de IL-6 nos animais que receberam OUA 14 dias após o ICV, onde os animais apresentaram comportamentos do tipo-depressivo. Juntos, esses dados reforçam a hipótese de que essas alterações nos níveis dessa citocina podem ocorrer tanto em episódios de mania quanto episódios de depressão. A IL-6 é considerada uma citocina pleiotrópica que tem uma importante interação entre o sistema imune e o SNC (Trapero e Cauli, 2014). Além disso, sabe-se que a IL-6 regula muitos processos fisiológicos nas células cerebrais. Apesar de que níveis aumentados de IL-6 são normalmente prejudiciais e estão associados a diversos transtornos mentais, existem evidências de que níveis basais de IL-6 possuem propriedades anti-inflamatórias e propriedades imunossupressoras, além de ter capacidade regulatória sobre sobrevivência e função neuronal (Guzmán e Hallal-Calleros, 2010). Estudos anteriores demonstraram que a falta de IL-6 no hipocampo pode estar associada com danos de memória (Baier et al., 2009). Sugere-se, portanto, que uma diminuição significativa da IL-6 pode ser prejudicial ao cérebro. Podemos sugerir que as alterações nos níveis de citocinas em pacientes bipolares podem estar associadas, ao menos em parte, a alterações na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, uma vez que a OUA alterou os níveis desses parâmetros.

A tabela 2 mostra um resumo geral sobre os resultados encontrados no presente estudo, onde a OUA desencadeou um comportamento semelhante a um episódio de mania sete dias após sua administração ICV, que foi seguido por alterações do tipo depressivo 14 dias depois. Além disso, esse composto induziu um aumento em todos os mediadores inflamatórios medidos (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e CINC-1) 14 dias após o ICV. A administração de Li diminuiu ou reverteu todas essas alterações comportamentais e neuroquímicas, indicando que a administração de OUA é um modelo válido para estudar a neuroinflamação no TB. Uma vez

que algumas citocinas também estão significativamente alteradas em pacientes bipolares, esse modelo experimental pode ser útil para a triagem de novos fármacos para a terapia do TB.

		Resultados				LCRa	LCRa+Li	OUA	OUA+Li
Comportamento 7 dias	Campo aberto	Cruzamentos				-	-	↑	↓
		Levantamentos				-	-	↑	↓
Comportamento 14 dias	Campo aberto	Cruzamentos				-	-	-	-
		Levantamentos				-	-	-	-
	Natação forçada	Imobilidade				-	↓	↑	↓
		Nado				-	↑	↓	↑
		Cortex Frontal				Hipocampo			
		LCRa	LCRa+Li	OUA	OUA+Li	LCRa	LCRa+Li	OUA	OUA+Li
Análises Bioquímicas	IL-1 β	-	-	↑	↓	-	-	↑	↓
	IL-6	-	-	↑	↓	-	-	↑	↓
	IL-10	-	-	↑	↓	-	-	↑	↓
	TNF- α	-	-	↑	↓	-	-	↑	↓
	CINC-1	-	-	↑	↓	-	-	↑	↓

Tabela 2: Resultados comportamentais e bioquímicos do presente estudo. De modo geral, a OUA induziu comportamentos do tipo- maníaco e depressivo, além de neuroinflamação, os quais foram revertidos pelo tratamento com Li. Legenda: ↑aumento; ↓diminuição/reversão; - Sem Alteração; LCRa = Líquido cefalorraquidiano artificial; CINC-1 = Neutrófilo quimioatratante induzido por citocina; IL = Interleucina; Li = Lítio; OUA = Ouabaína; TNF- α = Fator de necrose tumoral α .

Um ponto importante que acaba se tornando uma limitação do estudo, é o fato de que não foi feita a inclusão de fêmeas no estudo. Sabe-se atualmente que é de extrema importância a avaliação de ambos os sexos nas pesquisas, uma vez que o TB acomete pacientes de ambos os sexos. Além disso, existia o argumento onde fêmeas sofriam de interferências hormonais, o que poderia afetar o tratamento. Entretanto, um paciente do sexo feminino acometido pelo TB não renunciará ao tratamento por conta dessas alterações naturais de ciclo menstrual. No entanto, cabe ressaltar que no início do estudo ainda era costume utilizar apenas machos para maior homogeneidade da amostra. Sendo assim, em estudos futuros serão feitos os experimentos em animais de ambos os sexos.

No presente estudo não foram avaliados os comportamentos do tipo-depressivo após sete dias, além dos níveis dos mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e CINC-1), pelo fato de que nosso grupo de pesquisa já avaliou esses parâmetros sete dias após a administração ICV de OUA (Tonin et al., 2014; Valvassori et al., 2015; Valvassori et al., 2019a). Sendo assim, com a finalidade de reduzir o número de animais utilizados nos

experimentos, optou-se por avaliar os níveis desses mediadores inflamatórios apenas 14 dias após o ICV de OUA, os quais ainda não haviam sido avaliados. Cabe ressaltar que este foi o primeiro estudo avaliando os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e CINC-1 em um modelo animal de TB, induzido por OUA, 14 dias após o ICV.

O presente estudo se mostrou relevante para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TB no que tange aspectos neuroinflamatórios, correlacionados com comportamentos característicos de ambos os episódios do transtorno.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou as alterações neuroinflamatórias induzidas por OUA em cérebros de ratos submetidos ao modelo animal de TB. Foi observado um aumento no número de cruzamentos e levantamentos no teste do campo aberto, nos animais que receberam OUA, sete dias após o ICV. Além disso, 14 dias após o ICV, os mesmos animais que receberam OUA, apresentaram aumento no tempo de imobilidade durante o teste de natação forçada, caracterizando um comportamento do tipo-depressivo, contemplando assim, a validade de face para um modelo de TB.

Em relação aos parâmetros neuroinflamatórios, avaliados através dos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e CINC-1, foram observados aumentos nos níveis desses mediadores nos animais que receberam OUA, quando comparados ao grupo controle. Sendo assim, o presente estudo contemplou a validade de construção do modelo animal de TB.

Além disso, o Li, medicamento padrão na terapia de TB, foi capaz de mitigar as alterações comportamentais e fisiopatológicas induzidas no modelo (validade preditiva), que é o critério final para validar a administração de OUA como modelo de TB. Portanto, o presente estudo se torna uma boa ferramenta para compreender melhor as alterações neuroinflamatórias presentes durante as alterações de humor, observadas nos diferentes episódios do TB. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender esses mecanismos.

REFERÊNCIAS

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.

Akula N, Barb J, Jiang X, Wendland JR, Choi KH, Sen SK, Hou L, Chen DT, Laje G, Johnson K, Lipska BK, Kleinman JE, Corrada-Bravo H, Detera-Wadleigh S, Munson PJ, McMahon FJ. RNA-sequencing of the brain transcriptome implicates dysregulation of neuroplasticity, circadian rhythms and GTPase binding in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2014 Nov;19(11):1179-85.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5a ed. Washington, DC; 2013.

Anderson G, Maes M. Bipolar Disorder: Role of immune-inflammatory cytokines, oxidative and nitrosative stress and tryptophan catabolites. *Curr Psych Rep*. 2015;17:1-9.

Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP. Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 37(1):56-61.

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

Barrientos R, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*. 2015;309:84-99.

Berk M, Brnabic A, Dodd S, Kelin K, Tohen M, Malhi GS, et al. Does stage of illness impact treatment response in bipolar disorder? Empirical treatment data and their implication for the staging model and early intervention. *Bipolar Disord*. 2011;13:87-98.

Beyer DKE, Freund N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. *Int J Bipolar Disord*. 2017;5(1):35. doi: 10.1186/s40345-017-0104-6.

Bonnin CM, Sanchez-Moreno J, Martinez-Aran A, et al. Subthreshold symptoms in bipolar disorder: impact on neurocognition, quality of life and disability. *J Affect Disord.* 2012;136:650-9.

Brietzke E, Stabellini R, Grassis-Oliveira R, Lafer B. Cytokines in bipolar disorder: recent findings, deleterious effects but promise for future therapeutics. *CNS Spectr.* 2011 Jul 1;16(7):157-168.

Cade JF. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust.* 1949;2(10):349.
Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity.* 2017;46(6):927.

Craddock N, Sklar P. Genetics of bipolar disorder. *Lancet* 2013;381:1654–62.

de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocina e dor; *Rev Bras Anesthesiol*, 2011; 61: 2: 255-265

de Sousa RT, Zarate CA Jr, Zanetti MV, Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, Machado-Vieira R. Oxidative stress in early stage Bipolar Disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res.* 2014;50:36-41. doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.11.011.

Doty KR, Guillot-Sestier MV, Town T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: adaptive or maladaptive?. *Brain Res.* 2015;1617:155- 73.

Etain B, Aas M, Andreassen OA, Lorentzen S, Dieset I, Gard S, Kahn JP, Bellivier F, Leboyer M, Melle I, Henry C . Childhood trauma is associated with severe clinical characteristics of bipolar disorders. *J Clin Psychiatry.* 2013.

Ferrari AJ, Norman RE, Freedman G, Baxter AJ, Pirkis JE, Harris MG, Page A, Carnahan E, Degenhardt L, Vos T, Whiteford HA. The burden attributable to mental and substance use disorders as risk factors for suicide: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLoS One.* 2014;9(4):e91936.

Freudenreich O, Nejad SH, Francis A, Fricchione GL. Psychosis, mania, and catatonia. In: Textbook of Psychosomatic Medicine: Psychiatric Care of the Medically Ill, Second Edition, Levenson JL (Ed), American Psychiatric Publishing, Washington, DC 2011. p.219.

Geddes JR, Miklowitz DJ. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*. 2013 May 11;381(9878):1672-82.

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.

Gildengers AG, Chung KH, Huang SH, Begley A, Aizenstein HJ, Tsai SY. Neuroprogressive effects of lifetime illness duration in older adults with bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 2014 Sep;16(6):617-23.

Gilman SE, Ni MY, Dunn EC, Breslau J, McLaughlin KA, Smoller JW, Perlis RH. Contributions of the social environment to first-onset and recurrent mania. *Mol Psychiatry*. 2015;20(3):329.

Goodwin FK, Jamison KR. Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression, 2nd edition, Oxford University Press, New York 2007.

Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet*. 2016;387(10027):1561-1572.

Gutierrez-Rojas L, Gurpegui M, Ayuso-Mateos JL, Gutierrez-Ariza JA, Ruiz-Veguilla M, Jurado D. Quality of life in bipolar disorder patients: a comparison with a general population sample. *Bipolar Disord*. 2008;10:625-34.

Hajek T, Cullis J, Novak T, Kopecek M, Höschl C, Blagdon R, O'Donovan C, Bauer M, Young LT, Macqueen G, Alda M. Hippocampal volumes in bipolar disorders: opposing effects of illness burden and lithium treatment. *Bipolar Disord*. 2012 May;14(3):261-70.

Hall CS, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in Psychology. 1932; 6(1):1-12.

Hamdani N, Tamouza R, Leboyer M. Immuno-inflammatory marker of bipolar disorder: a review of evidence. *Front Bioscience (Elite Ed)*. 2012;4:2170-82.

Hayes JF, Marston L, Walters K, King MB, Osborn DPJ. Mortality gap for people with bipolar disorder and schizophrenia: UK-based cohort study 2000-2014. *Br J Psychiatry*. 2017;211(3):175-181.

Hirschfeld RM. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2014;169(Suppl1):S12-6.

Holtzman JN, Miller S, Hooshmand F, Wang PW, Chang KD, Hill SJ, Rasgon NL, Ketter TA . Childhood-compared to adolescent-onset bipolar disorder has more statistically significant clinical correlates, *J Affect Disord*. 2015;179:114.

Horrobin DF, Lieb J. A biochemical basis for the actions of lithium on behaviour and on immunity: relapsing and remitting disorders of inflammation and immunity such as multiple sclerosis or recurrent herpes as manic-depression of the immune system. *Med Hypotheses*. 1981;7(7):891-905.

Howland JG, Greenshaw AJ, Winship IR. Practical Aspects of Animal Models of Psychiatric Disorders. *Can J Psychiatry*. 2019;64(1):3-4

Jin HJ, McCrone P. Estudos de custo-doença para transtorno bipolar: revisão sistemática de estudos internacionais . *Farmacêutica* . 2015; 33 : 341-53.

Joanna R. Rozisky, Gabriela Laste, Liciane F. Medeiros, Vinicius S. dos Santos, Lauren S. Adachi, Isabel C. de Macedo, Wolnei Caumo, Iraci L. S. Torres. Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 4(1): 351-367, 2014

Jones S, Riste L, Barrowclough C, Bartlett P, Clements C, Davies L, et al. Reducing relapse and suicide in bipolar disorder: practical clinical approaches to identifying risk, reducing harm and engaging service users in planning and delivery of care – the PARADES (Psychoeducation, Anxiety, Relapse, Advance Directive Evaluation and Suicidality) Programme. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2018. v. 6. p. 1-332.

Joep R, Cheng Y, Lowell J, Worthen R, Sitbon Y, Beurel E. Stressed and inflamed, can GSK3 be blamed? *Trends Biochem Sci.* 2016;42:180-92.

Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, et al. A história natural de longo prazo do estado sintomático semanal de transtorno bipolar I . *Arch Gen Psychiatry* . 2002; 59 : 530- 7.

Judd LL, Schettler PJ, Akiskal HS, et al. Estado sintomático a longo prazo dos transtornos bipolares I vs. bipolares II . *Int J Neuropsychopharmacol* . 2003; 6 : 127-37.

Judd LL, Schettler PJ, Solomon DA, et al. A incapacidade psicossocial e a função do papel no trabalho foram comparadas ao longo do curso de transtorno depressivo bipolar I, bipolar II e unipolar major . *J Affect Disord* . 2008; 108 : 49-58.

Kamali M, Krishnamurthy VB, Baweja R, et al. Lithium. In: *The American Psychiatric Association Publishing Textbook of Psychopharmacology, Fifth Edition*, Schatzberg AF, Nemeroff CB (Eds), American Psychiatric Association Publishing, Arlington, VA 2017. p.889.

Kargar, M., Yousefi, A., Mojtahedzadeh, M., Akhondzadeh, S., Artounian, V., Abdollahi, A., Ahmadvand, A., Ghaeli, P., 2014. Effects of celecoxib on inflammatory markers in bipolar patients undergoing electroconvulsive therapy: a placebo-controlled, double-blind, randomised study. *Swiss Med. Wkly.* 144.

Kato T. Searching for the molecular basis of bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2015;172(11):1057.

Kessing LV, Hansen HV, Hvenegaard A, et al. Treatment in a specialised out-patient mood disorder clinic v. standard out-patient treatment in the early course of bipolar disorder: randomised clinical trial. *Br J Psychiatry.* 2013;202:212-9.

Kessing LV, Munkholm K, Faurholt-Jepsen M, Miskowiak KW, Nielsen LB, Frikke-Schmidt R, Ekstrøm C, Winther O, Pedersen BK, Poulsen HE, McIntyre RS, Kapczinski F, Gattaz WF, Bardram J, Frost M, Mayora O, Knudsen GM, Phillips M, Vinberg M. The Bipolar Illness Onset study: research protocol for the BIO cohort study. *BMJ Open*. 2017 Jun 23;7(6):e015462.

Kim Y, Santos R, Gage FH, Marchetto MC. Molecular Mechanisms of Bipolar Disorder: Progress Made and Future Challenges. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:30.

Kim, Y.K., Jung, H.G., Myint, A.M., Kim, H., Park, S.H., 2007. Imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in bipolar disorder. *J. Affect. Disord*. 104, 91–95.

Klengel T, Binder EB. Epigenetics of Stress-Related Psychiatric Disorders and Gene × Environment Interactions. *Neuron*. 2015 Jun 17;86(6):1343-57.

Knijff, E.M., Breunis, M.N., Kupka, R.W., de Wit, H.J., Ruwhof, C., Akkerhuis, G.W., Nolen, W.A., Drexhage, H.A., 2007. An imbalance in the production of IL-1 β and IL-6 by monocytes of bipolar patients: restoration by lithium treatment. *Bipolar Disord*. 9, 743–753.

Kraft AD, McPherson CA, Harry GJ. Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neural death or survival. *Neurotoxicology*. 2009;30(5): 785-93.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins patologia básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Kuteeva E, Hökfelt T, Wardi T, Ogren SO. Galanin, galanin receptor subtypes and depression-like behaviour. *EXS*. 2010; 102(1):163-81.

Lakshmi N Yatham, Sidney H Kennedy, Sagar V Parikh, Ayal Schaffer, David J Bond, Benicio N Frey, Verinder Sharma, Benjamin I Goldstein, Soham Rej, Serge Beaulieu, Martin Alda, Glenda MacQueen, Roumen V Milev, Arun Ravindran, Claire O'Donovan, Diane McIntosh, Raymond W Lam, Gustavo Vazquez, Flavio Kapczinski, Roger S McIntyre, Jan Kozicky, Shigenobu Kanba, Beny Lafer, Trisha Suppes, Joseph R Calabrese, Eduard Vieta, Gin Malhi, Robert M Post, Michael Berk. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder, *Bipolar Disorders*. 2018; 20:97–170

Laursen TM, Wahlbeck K, Hällgren J, Westman J, Ösby U, Alinaghizadeh H, Gissler M, Nordentoft M. Life expectancy and death by diseases of the circulatory system in patients with bipolar disorder or schizophrenia in the Nordic countries. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e67133.

Leboyer M, Soreca I, Scott J, Frye M, Henry C, Tramouza R, et al. Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? *J Affective Disorders*. 2012; 141(1): 1-10.

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. Differential response of bipolar and normal control lymphoblastoid cell sodium pump to ethacrynic acid. *J Affect Disord*. 2004; 80(1):11-7.

Liu, H.C., Yang, Y.Y., Chou, Y.M., Chen, K.P., Shen, W.W., Leu, S.J., 2004. Immunologic variables in acute mania of bipolar disorder. *J. Neuroimmunol*. 150, 116–122.

Longitudinal course of pediatric bipolar disorder. Birmaher B. *Am J Psychiatry*. 2007;164(4):537.

Looney SW, el-Mallakh RS. Meta-analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depress Anxiety*. 1997; 5(2):53-65.

López-Jaramillo C, Vargas C, Díaz-Zuluaga AM, Palacio JD, Castrillón G, Bearden C, Vieta E. Increased hippocampal, thalamus and amygdala volume in long-term lithium-treated bipolar I disorder patients compared with unmedicated patients and healthy subjects. *Bipolar Disord*. 2017;19(1):41. Epub 2017 Feb 27.

Lyon, M. Animal models of mania and schizophrenia. In P. Willner (Org.), *Behavioral Models in Psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives* 1991, 253-310.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Volume 28, Issue 2, 2004, 209-224.

Mack AA, Gao Y, Ratajczak MZ, Kakar S, El-Mallakh RS. Review of animal models of bipolar disorder that alter ion regulation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;107:208-214.

Maddu N, Raghavendra PB. Review of lithium effects on immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015;37(2):111-25.

Malhi G, Irwin L, Hamilton A, Morris G, Boyce P, Mulder R, et al. Modelling mood disorders: An ACE solution? *Bipolar Disord*. 2018;20:4-16.

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.

Matsumori A, Ono K, Nishio R, Igata H, Shioi T, Matsui S, Furukawa Y, Iwasaki A, Nose Y, Sasayama S. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. *Circulation*. 1997; 96: 1501–1506.

McGonigle P. Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87, 140-149.

Merikangas KR, Jin R, He J, et al. Prevalência e Correlatos do Transtorno do Espectro Bipolar na Iniciativa de Pesquisa Mundial de Saúde Mental. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 68 (3): 241–251.

Michalak EE, Murray G, Crest BD. Development of the QoL.BD: a disorder-specific scale to assess quality of life in bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 2010;12:727-40.

Michalak EE, Torres IJ, Bond DJ, Law RW, Yatham LN. The relationship between clinical outcomes and quality of life in first- episode mania: a longitudinal analysis. *Bipolar Disorder*, 2013; 15: 188-98.

Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):15- 25.

Monfrim, X., Gazal, M., De Leon, P.B., Quevedo, L., Souza, L.D., Jansen, K., Oses, J.P., Pinheiro, R.T., Silva, R.A., Lara, D.R., Ghisleni, G., Spessato, B., Kaster, M.P. Immune dysfunction in bipolar disorder and suicide risk: is there an association between peripheral corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 β ? *Bipolar Disord* 2014.

Mota, R., Gazal, M., Acosta, B.A., de Leon, P.B., Jansen, K., Pinheiro, R.T., Souza, L.D., Silva, R.A., Oses, J.P., Quevedo, L., Lara, D.R., Ghisleni, G., Kaster, M.P., 2013. Interleukin-1 β is associated with depressive episode in major depression but not in bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 47, 2011–2014.

Moreno DH, Andrade LH. The lifetime prevalence, health services utilization and risk of suicide of bipolar spectrum subjects, including subthreshold categories in the Sao Paulo ECA study. *J Affect Disord.* 2005;87:231-41.

Muller-Oerlinghausen, B., Berghofer, A., & Bauer, M. (2002): Bipolar disorder. *The Lancet*, 359, 241-247.

Muneer A. The Neurobiology of Bipolar Disorder: An Integrated Approach. *Chonnam Med J.* 2016a;52(1):18-37. doi: 10.4068/cmj.2016.52.1.18.

Munkholm K, Braüner JV, Kessing LV, Vinberg M. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res.* 2013b;47(9):1119-33.

Munkholm K, Vinberg M, Kessing LV. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 2013a;144(1-2):16-27.

Nassar A, Azab AN. Effects of lithium on inflammation. *ACS Chem Neurosci.* 2014;5(6):451-8.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Natural Neuroscience.* 2010; 13:1161-9.

Neto PRN, Carvalho AF. Manejo de casos refratários de transtorno bipolar. In: Kapczinski, F; Quevedo, J. editores. *Transtorno Bipolar. Teoria e clínica.* 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2016.

Nurnberger JI Jr, Koller DL, Jung J, Edenberg HJ, Foroud T, Guella I, Vawter MP, Kelsoe JR, Psychiatric Genomics Consortium Bipolar Group. Identification of pathways for bipolar disorder: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2014 Jun;71(6):657-64.

O'Donnell, K. C., & Gould, T. D. (2007). The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31, 932–962.

Organização Mundial da Saúde, *The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. Genebra, Suíça Organização Mundial da Saúde 2002.

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.

Peedicayil J. Epigenetic approaches for bipolar disorder drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2014;9(8):917-30.

Phillips ML, Kupfer DJ. Bipolar disorder diagnosis: challenges and future directions. *Lancet*. 2013 May 11;381(9878):1663-71.

Post RM, Luckenbaugh DA, Leverich GS, Altshuler LL, Frye MA, Suppes T, Keck PE, McElroy SL, Nolen WA, Kupka R, Grunze H, Walden J. Incidence of childhood-onset bipolar illness in the USA and Europe. *Br J Psychiatry*. 2008;192(2):150.

Powell TR, Dima D, Frangou S, Breen G. Telomere Length and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2018;43(2):445. Epub 2017 Jun 16.

Prut, L., Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 463, 3-33 (2003).

Raabe FJ e Spengler D. Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Frontiers in psychiatry*, v. 4, n. August, p. 80, 2013.

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 778 p. ISBN 9788535241723.

Resende R, Fernandes T, Pereira AC, De Pascale J, Marques AP, Oliveira P, Morais S, Santos V, Madeira N, Pereira CF, Moreira PI. Mitochondria, endoplasmic reticulum and innate immune dysfunction in mood disorders: Do Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) play a role? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(6):165752.

Robert M. Post, Jaclyn Fleming, Flavio Kapczinski. Neurobiological correlates of illness progression in the recurrent affective disorders, *Journal of Psychiatric Research*, Volume 46, Issue 5, 2012. Pages 561-573.

Roberts RJ, Repass R e el-Mallakh RS. Effect of dopamine on intracellular sodium: A common pathway for pharmacological mechanism of action in bipolar illness, *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2010, 11:2-2, 181-187.

Rosa AR, Gonzalez-Ortega I, Gonzales-Pinto A, et al. One-year psychosocial functioning in patients in the early vs. late stage of bipolar disorder. *Acta Psychiatrica Scand.* 2012; 125:335-41.

Rosenblat J, McIntyre R. Bipolar disorder and immune dysfunction: epidemiological findings, proposed pathophysiology and clinical implications. *Brain Sci.* 2017;7:1-19.

Rosenblat J, McIntyre R. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin North Am.* 2016;39:125-37.

Rowland TA, Marwaha S. Epidemiology and risk factors for bipolar disorder. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2018;8(9):251-69.

Schaffer A, Isometsa ET, Tondo L, Moreno D, Turecki G, Reis C, et al. International Society for Bipolar Disorders Task Force on Suicide: meta-analyses and meta-regression of correlates of suicide attempts and suicide deaths in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2015;17(1):1-16

Schneider MR, DelBello MP, McNamara RK, Strakowski SM, Adler CM. Neuroprogression in bipolar disorder. *Bipolar Disorders* 2012 Jun;14(4):356-74.

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.

Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):41-78.

Söderlund, J., Olsson, S.K., Samuelsson, M., Walther-Jallow, L., Johansson, C., Erhardt, S., Landén, M., Engberg, G., 2011. Elevation of cerebrospinal fluid interleukin-1 β in bipolar disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 36, 114–118.

Solomon DA, Leon AC, Coryell WH, Endicott J, Li C, Fiedorowicz JG, Boyken L, Keller MB. Longitudinal course of bipolar I disorder: duration of mood episodes. *Arch Gen Psychiatry.* 2010;67(4):339.

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

Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications.* 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2013.

Stertz L, Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Current Opinion Psychiatry.* 2013;26(1):19-26.

Strakowski SM, Adler CM, Almeida J, Altshuler LL, Blumberg HP, Chang KD, DelBello MP, Frangou S, McIntosh A, Phillips ML, Sussman JE, Townsend JD. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disorders.* 2012 Jun;14(4):313-25.

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.* 2013a;147(1-3):325-30.

Sugaya L, Hasin DS, Olfson M, Lin KH, Grant BF, Blanco C. Child physical abuse and adult mental health: a national study. *J Trauma Stress*. 2012 Aug;25(4):384-92.

Tsuchiya KJ, Byrne M, Mortensen PB. Risk factors in relation to an emergence of bipolar disorder: a systematic review. *Bipolar Disord*. 2003;5:231-42.

Trapero I, Cauli O, 2014. Interleukin 6 and cognitive dysfunction. *Metab. Brain Dis*. 29, 593-608.

Valvassori SS, Budni J, Varela RB, Quevedo J. Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35(2):121-31.

Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Varela RB, Lopes-Borges J, Cararo JH, Quevedo J. Validation of the animal model of bipolar disorder induced by Ouabain: face, construct and predictive perspectives. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):158.

Veiga-Fernandes H, Artis D. Neuronal-immune system cross-talk in homeostasis. *Science*. 2018;359(6383):1465.

Vieta E, Günther O, Locklear J, Ekman M, Miltenburger C, Chatterton ML, Åström M, Paulsson B. Effectiveness of psychotropic medications in the maintenance phase of bipolar disorder: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(8):1029-49.

Yatham LN, Fountoulakis KN, Rahman Z, Ammerman D, Fyans P, Marler SV, Baker RA, Carlson BX. Efficacy of aripiprazole versus placebo as adjuncts to lithium or valproate in relapse prevention of manic or mixed episodes in bipolar I patients stratified by index manic or mixed episode. *J Affect Disord*. 2013;147(1-3):365-72.

Yu HS, Kim SH, Park HG, Kim YS, Ahn YM. Intracerebroventricular administration of ouabain, a Na/K-ATPase inhibitor, activates tyrosine hydroxylase through extracellular signal-regulated kinase in rat striatum. *Neurochem Int*. 2011;59(6):779-86.

Zouikr I, Hasegawa-Ishii S, Shimada A. Editorial: Neuroimmune Interface in Health and Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:1315.